

## 部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合した 新規窒素除去プロセスの研究

著者	劉 媛
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16670号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/64057">http://hdl.handle.net/10097/64057</a>

博士学位論文

部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合  
した新規窒素除去プロセスの研究

2015 年 9 月

東北大学大学院環境科学研究科

地域環境・社会システム学コース

劉 媛

論文審査委員名

---

主査	東北大学教授	李	玉友
----	--------	---	----

---

東北大学教授	風間	聡
--------	----	---

---

東北大学教授	西村	修
--------	----	---

# 目次

第1章 序論 .....	1
1.1 研究の背景 .....	1
1.2 研究の目的 .....	3
1.3 本論文の構成 .....	3
第1章 参考文献 .....	6
第2章 既往の研究 .....	7
2.1 研究背景 .....	7
2.2 人為的要因による環境中の窒素汚染 .....	7
2.2.1 高窒素含有排水のまとめ .....	7
2.3 従来の窒素除去方法 .....	8
2.3.1 物理化学的处理技術 .....	8
2.3.2 生物学的处理技術 .....	9
2.3.3 従来生物学的硝化脱窒法の課題 .....	11
2.3.4 亜硝酸型硝化脱窒法 .....	11
2.4 アナモックス反応による窒素処理技術 .....	12
2.4.1 Anammox 細菌の生理特性 .....	13
2.5 研究課題の整理 .....	14
第2章 参考文献 .....	17
第3章 酸素制御による部分的亜硝酸化の実現と維持 .....	24
3.1 はじめに .....	24
3.2 実験方法 .....	26
3.2.1 実験装置および実験条件 .....	26
3.2.2 基質組成 .....	26
3.2.3 種汚泥 .....	26
3.2.4 運転条件 .....	26

3.2.5	測定項目と分析方法 .....	27
3.3	実験結果および考察 .....	29
3.3.1	部分的亜硝酸化の実現 .....	29
3.3.2	部分的亜硝酸化の制御 .....	29
3.4	結論 .....	33
第3章	参考文献 .....	34
第4章	部分的亜硝酸化リアクターにおける ANAMMOX 反応への転換 .....	37
4.1	はじめに .....	37
4.2	実験方法 .....	38
4.2.1	実験装置および実験条件 .....	38
4.2.2	測定項目と分析方法 .....	39
4.3	実験結果および考察 .....	39
4.3.1	部分的亜硝酸化条件の確立と長期運転における Anammox 反応 ..	39
4.3.2	Anammox 反応への転換 .....	40
4.3.2	他の研究との比較 .....	41
4.4	結論 .....	43
第4章	参考文献 .....	44
第5章	担体添加型一槽式 ANAMMOX を用いた窒素除去の研究 .....	47
5.1	はじめに .....	47
5.2	実験方法 .....	48
5.2.1	実験装置および実験条件 .....	48
5.2.2	測定項目と分析方法 .....	49
5.2.3	走査型電子顕微鏡(SEM)の観察 .....	50
5.3	実験結果および考察 .....	50
5.3.1	リアクターの運転状況 .....	50
5.3.2	担体における微生物の増殖 .....	52
5.4	結論 .....	52

第 5 章 参考文献 .....	53
第 6 章 総括および展望 .....	55
6.1 総括 .....	55
6.2 今後の研究課題と展望 .....	56
使用記号 .....	57
謝辞 .....	59

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 研究の背景

窒素は、タンパク質、アミノ酸、および核酸などの構成物質であるため、すべての生命にとって必要不可欠である。生物圏のなかで窒素化合物の循環的変換はきわめて重要であり、窒素循環の中間体には数種の無機性窒素化合物や有機性窒素化合物がある。自然界における窒素循環経路の概略<sup>1,2)</sup>を図 1-1 に示した。

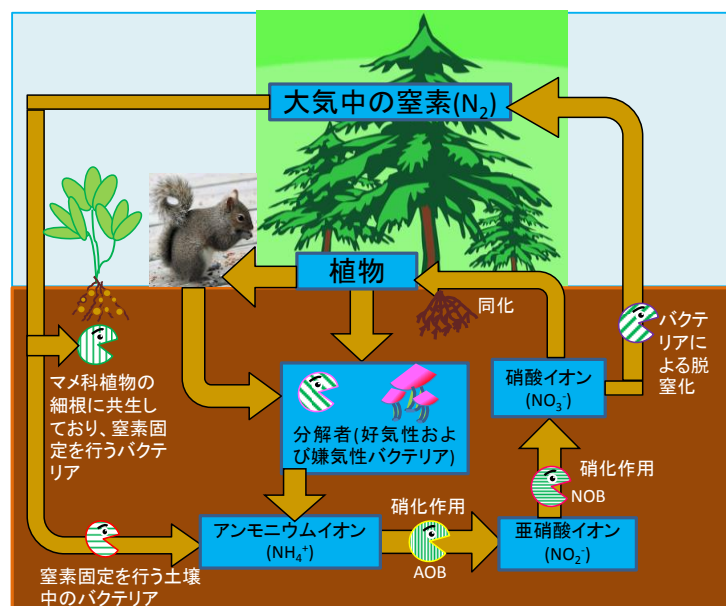


図 1-1 自然界における窒素循環経路の概略

自然界における窒素循環は主にニトロゲナーゼを持つ細菌と光合成植物によって支えられ、大気の 80% を占める窒素は、大豆などのマメ科植物に寄生する *Rizobium* (根粒菌)、好気性細菌の *Azotobacter* 属、嫌気性細菌の *Clostridium* 属、*Rhodopseudomonas* 属等の光合成細菌、藍藻類の *Nostoc* 属等により窒素固定される。窒素固定により植物や微生物に取り込まれた分子状窒素、アンモニアおよび硝酸などは有機性窒素を形成し、動物の餌となり体内で窒素化合物となる。

これらの動植物あるいは死骸、排泄物が最終的に微生物によって分解され、アンモニア性窒素となる。アンモニア性窒素は、硝化細菌の硝化作用(Nitrification)によって亜硝酸性窒素に酸化(*Nitrisomonas* 属, *Nitrosococcus* 属など, アンモニア酸化細菌)され、さらに亜硝酸性窒素は硝酸性窒素に酸化(*Nitrobacter* 属など, 亜硝酸酸化細菌)される。酸化された硝酸性窒素および亜硝酸性窒素は、硝酸還元反応によりアンモニア性窒素、あるいは脱窒素反応(Denitrification)により窒素ガスに還元され大気中に放出される。このような形で自然界における窒素循環のサイクルが完結している。

窒素を含んだ排水等が環境中に流出すると、様々な環境汚染を引き起こす。過剰なNやP等の陸上植物の重要な栄養素は長期間に亘って水系を通じて湖や海に流れ植物プランクトンが増え、蓄積などにより、流入続けることにより藍藻類などの一次生産者の増殖が促進され、いわゆる富栄養化が進行する<sup>3)</sup>。富栄養化は、湖沼、ダム湖、溜め池ではアオコ(無酸素化した海水が引き起こす水体の着色現象)、内湾や内海では赤潮(藻類の中で特に藍藻類の異常繁殖による水体の着色現象)に代表されている。その結果、pHの上昇、溶存酸素の低下、藍藻類により放出される2-MIB(ジメチルイソボルネオール)やジェオスミン等のためカビ臭問題や魚介類の大量斃死が発生する。また、アオコによる浄化処理の過障害、さらにトリハロメタン前駆物質の生成といった問題を誘発している。アオコの発生は悪臭や景観の悪化の原因になっており、水資源の利用にとって大きな被害が生じている。

以上に述べた通り、窒素を含む排水や家畜ふん尿が環境中に流出することで、様々な環境汚染を引き起こすため、水産資源の保護、海水浴・潮干狩・その他のレクリエーションの場の保全および健康影響の観点からこれらの排水は適切に処理しなければならない。実際の所、長年に渡り特に窒素に関して水質環境基準を達成していない湖沼や海域などの閉鎖性水域が多くあり、富栄養化を防止し水質改善を図るため、また東京湾、伊勢湾、瀬戸内海においては水質総量削減を達成するための有効な対策を講じる必要があり、今後益々排水の窒素除去技術は重要になってくると考えられる。



## 1.2 研究の目的

「1.1 研究の背景」に述べた通り、環境基準および水質総量削減を達成し健全な水環境および土壌環境への改善・維持のための窒素除去技術開発が強く切望されている。

窒素排水の処理技術は、物理学的あるいは化学的な方法と生物学的処理法がある。従来の生物学的硝化脱窒法、物理学と化学的方法よりコストが大幅に削減でき、組み合わせた様々な窒素除去法が開発されてきた。一方で、その施設の建設、維持管理に多大にコストが必要になることから、より効率的で、かつ経済的な窒素除去方法の開発が求められている。

従来の硝化脱窒法に比べ有利な点を多々有する部分的亜硝酸化およびアナモックスプロセスを活用する新規な窒素除去技術はその期待を答えることができる。部分的亜硝酸化処理による流入水の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  を約半量の  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  に酸化し、さらに、Anammox 細菌による生成された  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  と残しの  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  を窒素ガスに転換する。この部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスは従来の硝化・脱窒法に比べて供給酸素量を約 55%削減でき、外部炭素源の補填が必要としない、運転管理のコストおよび施設の敷地が大幅に削減できる。

そこで本研究では、まず低コストかつ安定した部分的亜硝酸化の実現および維持が可能な運転制御方法を明らかにすることを目的として、CSTR を用いた硝化反応実験を行い、段階的に DO 濃度を変化させたときの硝化反応における亜硝酸化率および流出水の  $\text{NO}_2^-\text{-N}/\text{NH}_4^+\text{-N}$  の変化などに関して検討を行った。次に、部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 細菌を蓄積させ、一槽式 Anammox プロセスの運転を試した。さらに、汚泥の保留を考えた上で、担体添加型の一槽式 Anammox プロセスにおける窒素除去性能を検討した。

## 1.3 本論文の構成

本論文の構成を図 1-2 に示す。本論文は全 6 章から成り、第 1 章および第 2 章で研究背景および本研究の目的と意義を述べ、第 3 章、第 4 章、第 5 章で本研究において行った実験結果および考察をまとめ、第 6 章で総括を行う構成となっている。各章の内容は以下の通りである。

第1章「総論」では、窒素含有の排水などが環境中に流出すると自然界における窒素循環のバランスが動揺され、その結果富栄養化、地下水の硝酸性窒素浸透、温室効果を持つ亜酸化窒素の放出などの様々な環境汚染を引き起こす。現在日本の水質環境基準達成状況を述べ、生物学的な処理方法による窒素排水の処理必要性を明らかにし、本研究の目的および意義を述べ、本論文の構成についてまとめた。

第2章「既往研究と研究課題の整理」では窒素肥料の使用が爆発的に増加に伴って世界人口も飛躍的に増長している。その結果人為的な活動により地球上での窒素の挙動と循環に大きな影響されているという背景を述べ、窒素除去方法の生物学的方法に関する既往研究および従来の知見の整理を行い、本研究の目的である「部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスの研究」に関する研究を進める上で、現状における問題点を明らかにし、本研究で解明すべき研究課題および本研究の位置付けについて整理した。

第3章「酸素制御による部分的亜硝酸化の実現と維持」では、部分的亜硝酸化実現方法を把握するとともに、反応槽における遊離アンモニアや遊離亜硝酸等の阻害因子の影響を明らかにすることを目的として、完全混合型反応槽を用いた硝化反応の連続実験を行い、段階的に溶存酸素（DO）を変化させた時の部分的亜硝酸化状況などに関して検討を行った。

第4章「部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 反応への転換」では、部分的亜硝酸化が長期間を運転した結果、多少の窒素除去が見られたため、段階的に曝気量を変化させることにより、部分的亜硝酸化リアクターにおける一槽式 Anammox 反応が発生し、窒素除去に及ぼす影響を明らかにした。

第5章「担体添加型一槽式 Anammox を用いた窒素除去の研究」では、担体の添加が一槽式 Anammoxo 反応槽における窒素の除去状況に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、担体を充填した完全混合型反応槽における一槽式 Anammox の室内連続実験を行い、第4章の実験結果と比較し、担体が一槽式

Anammox プロセスの運転特性に及ぼす影響を検討した.

第6章「総括および展望」では、本研究を通して得られた「部分的亜硝酸化とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスの研究」に関する研究成果について総括し、今後明らかにする必要性のある研究課題および「Anammox プロセスを核とした新規なプロセス」を中心とした省エネルギー型の都市下水処理プラントの構築に対する展望について述べた.

## 第1章 参考文献

- 1) 環境省，環境・循環型社会白書，pp. 11.
- 2) Limnology: Lake and river ecosystems, 3<sup>rd</sup> edition, Chapter 12 The nitrogen cycle, pp. 205-237, 2001.
- 3) Golterman, Developments in Water Science- Chapter 17 Nutrient budgets and eutrophication, Vol. 2, pp. 357-402, 1975.
- 4) Selman, M., Sugg, Z., Greenhalgh, S., Diaz, R., Eutrophication and hypoxia in coastal areas: A global assessment of the state of knowledge, Water Quality: eutrophication and hypoxia policy note series No.1, Washington, DC, 2008: World Resources Institute.
- 5) Diaz, R. J., and R. Rosenberg (2008), Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems, Science, 321, 926-929.
- 6) 環境省，水・大気環境局，平成 23 年度公共用水域水質測定結果，平成 24 年 12 月，環境省ホームページ <https://www.env.go.jp/water/suiiki/h23/full.pdf>
- 7) 環境省，第七次総量削減，平成 23 年 6 月，  
<https://www.env.go.jp/water/heisa/tplc.html>

## 第 2 章 既往の研究

### 2.1 研究背景

大気中の窒素は土壤中に棲息する根粒菌によってアンモニアに合成される。アンモニアは工業的にも合成されており、ドイツで開発されたハーバー・ボッシュ法（1914 年）と呼ばれる空中窒素固定法が一般的に用いられている。アンモニアや硝酸塩は重要な窒素肥料であり、このハーバー・ボッシュ法によるアンモニア合成のおかげで化学肥料が発明され、大気と鉱物から取り出された膨大な窒素が、肥料として環境に投入され、世界の食糧生産は飛躍的に増産が可能となった。1804 年に世界人口は 10 億人を超えて、それから 20 億人を破るまで 123 年間をかかって、その後わずかの 33 年間で 30 億人に突破し、14 年後 1974 年に 40 億人を達成した。しかし、1987 年以降世界人口が爆発し、12 年間当たり 10 億人に増大しており、2008 年前の 50 年間で世界人口が 2.5 倍に増大した。それに伴って、エネルギー消費が 3 倍、食糧生産は 5 倍に増加した<sup>1,2)</sup>。窒素肥料の使用、化石燃料の消費、根粒菌マメ化作物の植栽等の人為的な原因による生物学的に利用可能な窒素が陸上生物圏に進入する速度は産業革命以前のレベルと比較し、2 倍以上に増加した<sup>3)</sup>。食料・飼料の輸出入を介して大量の窒素が地球上を移動しているが、これらの人為的な活動により排出される生活排水や産業廃水、畜産ふん尿、窒素肥料の施肥が地球上での窒素の挙動と循環に大きな影響を与えている。

### 2.2 人為的要因による環境中の窒素汚染

#### 2.2.1 高窒素含有排水のまとめ

環境汚染を引き起こす原因となる窒素は主として、人為的活動により排出される生活排水や産業廃水、畜産ふん尿、窒素肥料の施肥などにより発生する。生活排水は下水処理場などで処理された後放流されるが、一部は環境中に流出し、水・土壌圏に蓄積し、河川、湖沼、海域へ流出する。生活排水における窒

窒素負荷は、し尿由来が全体の 80%を占めており、T-N で換算すると 50mg/L の生活排水が排出されていることとなる<sup>8)</sup>。一方産業排水は濃度、組成、流入の時間変動などにおいて、排水の性状も異なり、様々な変化を伴うため一定でない。窒素の排出濃度が高いとされる業種は、畜産、無機化学工場、生活関連業場などが挙げられる。

下水処理場からの余剰汚泥は嫌気性消化による COD を除去し、その後脱水焼却による処理されている。しかし脱水液中高濃度のアンモニア性窒素が含有しており、通常に下水処理場の流入水に返流し窒素の除去を行っている、しかし近年、別のプロセスにより脱水液の効率的な窒素除去の観点になっている。Rotterdam の Dokhaven 下水処理場における窒素収支の解析による脱水液の流量が流れ全体の数パーセントを占めているが、全体窒素負荷の 15%は脱水液からということが明らかになった<sup>9-11)</sup>。従って、消化脱水液による窒素負荷を削減すると、下水処理場の流出水における窒素濃度が大幅に減らすことができる。

一部の地域では豚舎肥料の過剰が生成され、需求量を超える部分は土壌促進剤廃棄物ではなくなり、廃棄物として廃棄されるようにしている。生の肥料の液体成分の組成は分離方法および動物飼料の組成物に依存する。しかし、多量の COD、窒素、およびリンが検出されている<sup>12)</sup>。

固体廃棄物の処理方法として行われている埋立地は嫌気性処理により COD を除去している<sup>13,14)</sup>。その結果、消化脱水液と同様に浸出水は高アンモニア性窒素と低 COD の特徴がある<sup>15)</sup>。

また、製菓排水、屠舎排水、でんぷん生産排水等の様々な工業排水は高濃度の窒素含有が確認されている<sup>16-18)</sup>。

## 2.3 従来の窒素除去方法

### 2.3.1 物理化学的処理技術

窒素含有濃縮排水 (>5000mg/L) の処理方法はアンモニアストリッピング法、ゼオライト吸着法や不連続点塩素処理法、電気透析法、選択的イオン交換法、逆浸透法、蒸留法などの物理化学的な方法は技術的および経済的に可能である。成功な例として、Harmesen らはアンモニアストリッピング法により工業規模の高濃度窒素処理が行われた<sup>33)</sup>。しかし低濃度排水 (<5000mg/L) の窒素除去方

法は、運転コストや維持管理性、最終生成物の環境への影響の観点など総合的に判断して現在は生物学的硝化脱窒法が主に用いられている。

### 2.3.2 生物学的処理技術

生物学的処理法には、タンパク質や尿素の形で流入し汚水中の窒素をアンモニウム性窒素 ( $\text{NH}_4^+$ ) から亜硝酸性窒素 ( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸性窒素 ( $\text{NO}_3^-$ ) に酸化した後、最終的に無害な窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) に還元し大気に放出される生物学的硝化脱窒法が一般である (図 2-2)。

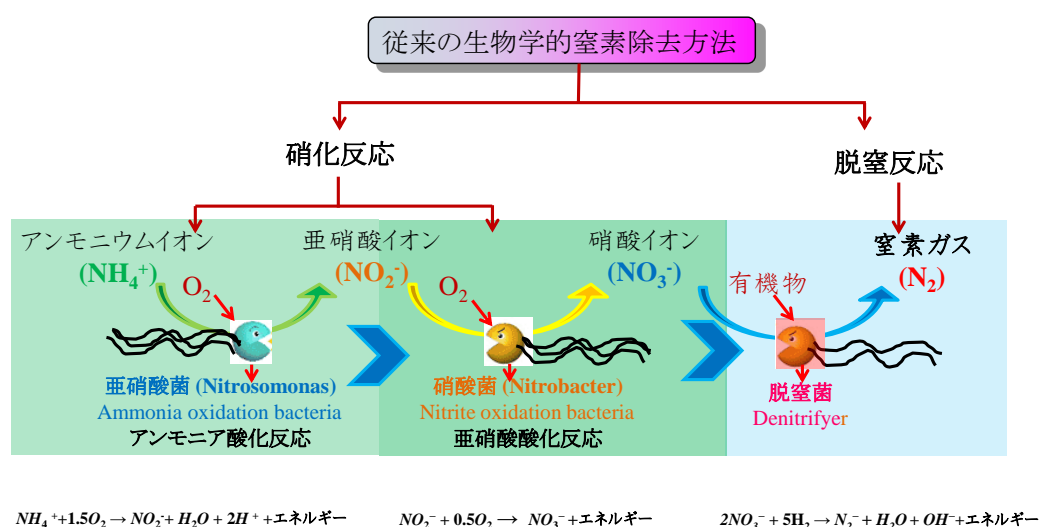
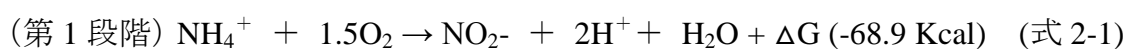
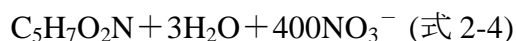
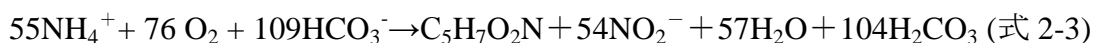


図 2-2 従来の生物学的窒素除去原理

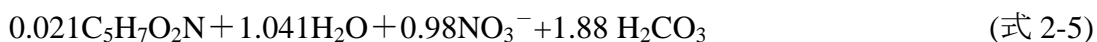
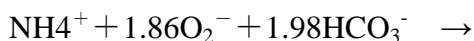
硝化反応においてアンモニアを完全に酸化して硝酸塩にするような無機炭素化合物を同化して増殖する独立栄養生物は知られていない。従って自然界でのアンモニアの硝化は2種類の別々の生物集団による連続的な反応である。これらはアンモニア酸化細菌 (AOB: Ammonia Oxidizing Bacteria, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* など) と亜硝酸酸化細菌 (NOB: Nitrite Oxidizing Bacteria, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* など) である。硝化反応は基本的に以下の亜硝酸生成と硝酸生成の2段階で進行する。



硝化プロセスを工学的に利用しようとする場合、プロセス制御を考える必要がある。その場合、細菌の増殖量のほかに酸素要求量、pH 制御など多くの因子を考慮しなければならない。式 2-1 および式 2-2 によってエネルギーを得る、細胞合成を行う。微生物の菌体は経験的に  $C_5H_7O_2N$  と近似して表されることを利用すると、AOB および NOB の増殖は次のように表せる。



従ってアンモニア酸化反応および亜硝酸酸化反応を AOB および NOB の増殖を考慮し、硝化反応の全体の反応は次のように表せる。

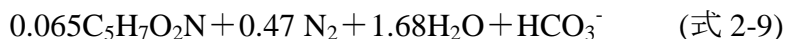


脱窒反応は、溶存酸素が存在しない条件下での通性嫌気性細菌の呼吸であり、硝化反応によって生成された硝酸性窒素および亜硝酸性窒素を還元して窒素ガスを生成する一連の反応である。



脱窒素細菌としては、*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Hyphomicrobium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* 等が代表的に知られており、分類学および生物学的な分布がきわめて広範囲にわたる。脱窒素細菌の脱窒素機能は、pH、温度および酸化還元電位（ORP）等に大きく影響される。脱窒素細菌の最適 pH は 7.0～7.5 であり、pH が低い場合には亜硝酸性窒素の蓄積および亜酸化窒素の生成が報告されている。最適温度は 34～37℃、最適 ORP は -100～-220mV であると報告されている。脱窒反応は電子供与体として様々な有機化合物を利用することができる。

細胞合成を考慮し、脱窒全体の反応は次のように表せる。





### 2.3.3 従来生物学的硝化脱窒法の課題

図 2-3 に従来の下水处理における代表的な生物学的硝化脱窒法の例を示した。近年ではリン除去も同時に可能な A2O 法（嫌気・無酸素・好気法）も普及しているが，そのプロセスは有機物が必要なく，脱窒速度は小さいものの高い窒素除去率が得られる。しかし，滞留時間を長くする必要があり，広い用地が必要となるなどの問題点がある。窒素除去とリン除去の運転は相反する部分が多いことから，安定した除去を行うには高度な運転管理が求められる。

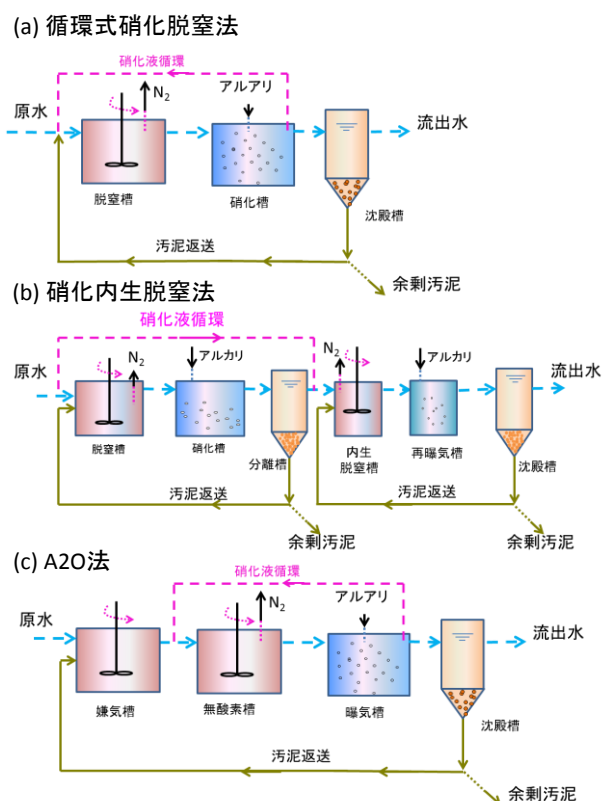


図 2-3 従来の生物学的硝化脱窒法の例

### 2.3.4 亜硝酸型硝化脱窒法

新しい窒素除去プロセスとして亜硝酸型硝化脱窒法 SHARON プロセスが誕生した。SHARON とは Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite で，Delft 工科大学で開発された<sup>35)</sup>。SHARON プロセスでは比較的高温（35℃）において NOB は AOB に比べて明らかに倍增時間が長いという特性を利用して，1 日等の短い滞留時間において高温の完全混合反応槽を使用することにより NOB はウォッシュアウトされる。また間欠曝気をすることによって脱窒

素と同時に pH 制御を行うことが可能である．硝化反応を亜硝酸まで止めることによって，エネルギーと電子供与体を節約することができる．

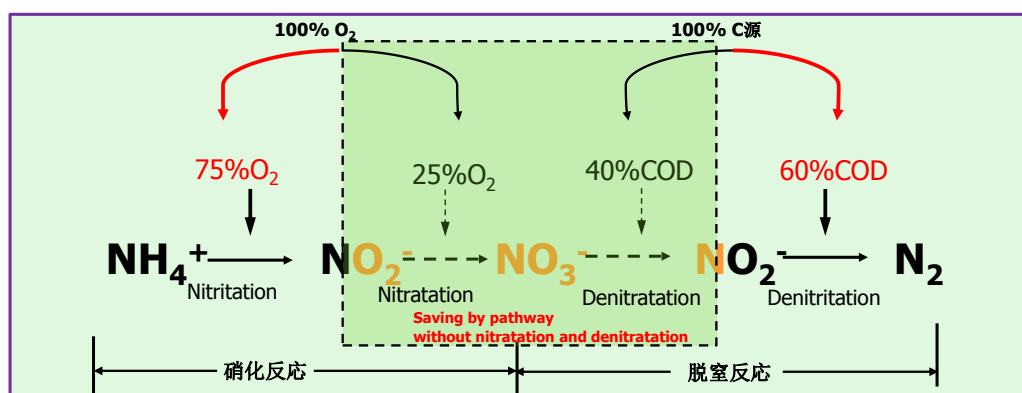


図 2-4 亜硝酸型硝化脱窒法

図 2-4 に示したようにプロセス全体としてこれまでの硝化脱窒法に比べて酸素供給量と電子供与体の使用量がそれぞれ 25% と 40% 節約可能になるだけでなく，汚泥の生成量も硝化反応および脱窒反応でそれぞれ 35% と 55% 程度削減可能となっている．

## 2.4 アナッモクス反応による窒素処理技術

1990 年代に，アナッモクス細菌を用いた脱窒技術 Anammox (Anaerobic AMMonium OXidation) プロセスが Kluyver Laboratory of Biotechnology of Delft により報告され，窒素循環も新たな定義をされた (図 2-5)．Anammox を核とした排水処理プロセスは、排水中の  $\text{NH}_4^+$  の約 60% を部分的に亜硝酸に酸化するという (1) 部分的亜硝酸化プロセス (式-10) により生成した  $\text{NO}_2^-$  と残留した  $\text{NH}_4^+$  を窒素ガスに変換する (2) Anammox プロセス (式-11) によって構成される．この二つのプロセスを同一水槽で同時に行う手法 (一槽式 Anammox) と二つの反応槽で別々に行う手法 (二槽式 Anammox) が提案されている．アナッモクス細菌は，アンモニアを電子供給体とし，亜硝酸を電子受容体をとし嫌気性の条件下で窒素ガスを生成する独立栄養性細菌である<sup>39-40)</sup>．部分的亜硝酸化 - Anammox, SHARON-Anammox などの二槽式 Anammox や，SNAP (Single stage Nitrogen removal using Anammox and Partial nitritation) 法，DEMON 法<sup>41,42)</sup> (aerobic/anoxic deammonification), CANON 法<sup>43,44)</sup> (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over

Nitrite) あるいは OLAND 法<sup>45,46)</sup> (Oxygen Limited autotrophic Nitrification-Denitrification) を代表する一槽式 Anammox についての研究が活発に行われている。それらは(1)有機物が COD 源として必要がなくなり, (2)曝気量も理論的に 55%削減でき, (3)余剰汚泥の発生量が 80%以上削減でき, (4)設備の省スペース化が可能などの有利点があり, アナモックスプロセスは省エネルギー型の窒素除去技術として認められた。

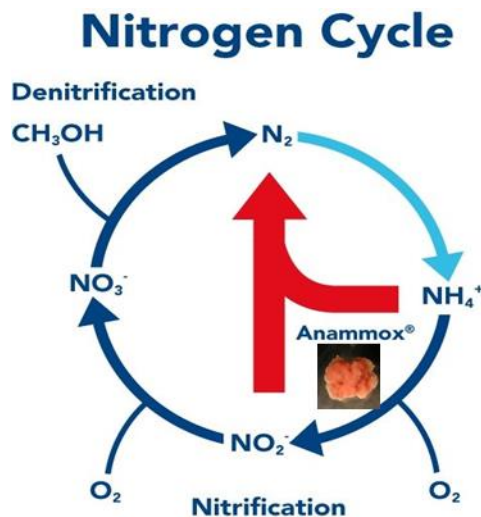
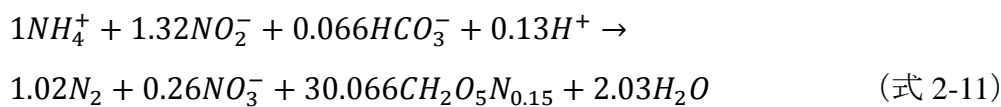


図 2-5 新たな窒素循環

#### 2.4.1 Anammox 細菌の生理特性

ANAMMOX 反応を担う細菌は  $1\mu\text{m}$  程度の直径を持つ球菌で, *Planctomycetes* に属する他の細菌と同様に発芽によって増殖する<sup>51)</sup>。また, 図 2-6 に示したように細胞内部は, 細胞質膜の内側に intracytoplasmic membrane があり, それに囲まれた領域に DNA が収納されて nucleoid となっており, リボソームを含む riboplasm, Anammox 反応に関係する Anammoxosome がそれぞれコンパートメント化されている。

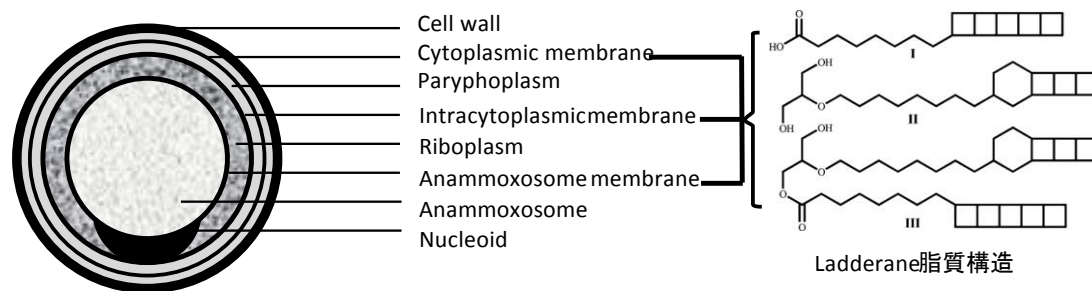


図 2-6 Anammox 細胞の構造<sup>47)</sup>

現在 Anammox 細菌は分離されていないが、16SrRNA 遺伝子に基づく系統解析から、Anammox 細菌は *Planctomycetes* 門 *Brocadiales* 目に属することが明らかとなっている。さらに属の階層まで分類は(1) *Candidatus Brocadia*; (2) *Candidatus Kuenenia*; (3) *Candidatus Jettenia*; (4) *Candidatus Anammoxoglobus*; (5) *Candidatus Scalindua*; (6) *Candidatus Anammoximicrobium* の 6 属がこれまでに報告されている<sup>48)</sup>。なお、Anammox 細菌はまだ純粋培養株が確立されていないため、正式な学名記載がされておらず、すべて系統分類学上の候補“*Candidatus*”（以下 *Ca.* とする）として付けられている。これらの 6 属のうち、は主に海水環境から検出され<sup>49-51)</sup>、その他が排水処理プロセスにおける様々な汚泥から馴化された<sup>52-57)</sup>。Anammox 反応は中米コスタリカの the Golfo Dulce 湾内の脱窒の 30~50% を占めることが *Nature* 誌に報告されている<sup>58)</sup>。安定同位体  $^{15}\text{N}$  を用いた活性実験、FISH 法による Anammox 細菌の特異的検出、Anammox 細菌特徴的な ladderane 脂質が確認されたことから、世界最大の無酸素性（酸素極小領地、OMZs）内湾である黒海において Anammox 細菌の存在が *Nature* 誌に別のグループに報告されている<sup>59)</sup>。日本でも安定同位体  $^{15}\text{N}$  を用い、Anammox 活性実験および系統解析を行い、瀬戸内海や伊勢湾の底泥から *Ca. Scalindua* 属を検出した<sup>60)</sup>。熱水噴出孔などの極限環境からも検出され、環境中に広く存在していることが確認されている<sup>61-62)</sup>。

## 2.5 研究課題の整理

本章では本研究の意義を明確にするために、窒素の除去に関する従来の研究を中心に、従来の知見を整理するとともに、現状における問題点を明らかとし

た．それらを踏まえて，本研究であら化にする必要のある研究課題および本研究の位置付けについて以下に整理した．

- (1) 窒素排水の生物学的除去方法の違いは下水道プロセスにおける温室効果ガス排出量に大きな影響を及ぼしている．そのため，有機物の投入が必要なし，低エネルギー・コストの新規な部分的亜硝酸化-アナモックス窒素除去方法を開発することができれば，従来の硝化脱窒法により温室効果ガス排出量を削減できるだけでなく，部分的亜硝酸化 - アナモックスプロセスにより酸素供給量および有機物や試薬添加量を大幅に削減できる可能性を有している．
- (2) 排水中にはアンモニア性窒素が含まれ，亜硝酸性窒素が含まれないため，アンモニアと亜硝酸を窒素ガスへと変換するアナモックス反応には適していない．そのため，原水中のアンモニアの 57% を亜硝酸に酸化する部分的亜硝酸化の研究は重要な研究課題になる．
- (3) これまでの部分的亜硝酸化の研究は CSTR(Continuous Stirred-Tank Reactor), SBR(Sequencing Batch Reactor), MBR(Membrane Bioreactor)が用いられている．しかし生物膜システムでは汚泥滞留時間のコントロールが難しいため，MBR を用いた場合長時間の亜硝酸化を維持できないと言われており，部分的亜硝酸化の実際の処理については CSTR あるいは SBR 懸濁型汚泥システムが適していると言われているが，CSTR による部分的亜硝酸化の研究事例は少ない．
- (4) 部分的亜硝酸化の実現については 1~2 日の短い SRT，温度を 30℃~35℃に制御することでできるが，短い SRT により大量の汚泥が流失し，リアクターの加温や槽内の曝気動力によりコストが高くなることが問題である．そこでエネルギーを削減できる方法として適切な DO 濃度を制御することは省エネルギー化および低コスト化に向けて有効な手法であると考えられる．

- (5) アナモックス反応を担う微生物 Anammox 細菌は増殖速度非常に低い、外部の環境、すなわち低水温、pH、有機物、基質の影響を受けやすいと報告している。そのため、アナモックスプロセスをスタートアップできるまで時間かかる。何らかの方法でスタートアップを促進させる必要がある。また、窒素除去速度を強化するために、アナモックス細菌を反応槽に長期間に保持することが必要になる。

以上知識に基づき、本研究の目的である「部分的亜硝酸化とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスを達成すること」を達成するには、まず低コストかつ安定した部分的亜硝酸化の実現および維持が可能な運転制御方法を明らかにすることは最も重要である。

そこで本研究では CSTR を用いた硝化反応実験を行い、段階的に DO 濃度を変化させたときの硝化反応における亜硝酸化率および流出水の  $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$  の変化などに関して検討を行った。次に、部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 細菌を蓄積させた。さらに、流動型担体を添加によりアナモックス細菌を反応槽に保持させ、一槽式 Anammox プロセスの運転を試した。担体なしおよび担体添加型の一槽式 Anammox プロセスにおける窒素除去性能を検討した。

## 第 2 章 参考文献

- 1) Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (2008),  
FAOSTAT database collections, Food and Agric. Org. of the U. N., Rome.  
<http://www.apps.fao.org>
- 2) Grübler, A., M. Jefferson, A. McDonald, S. Messner, N. Nakichenovich, H.-H. Rogner, and L. Schratzenholzer (1995), Global Energy Perspectives to 2050 and Beyond, World Energy Council/Int. Inst. for Appl. Syst. Anal., Laxenburg, Austria.
- 3) Galloway, J. N., et al. (2004), Nitrogen cycles: Past, present, and future, *Biogeochemistry*, 70, 153-226.
- 4) Galloway, J. N., and E. B. Cowling (2002), Reactive nitrogen and the world: 200 years of change, *Ambio*, 31, 64-71.
- 5) Green, P., C. J. Vorster, M. Meybeck, J. N. Galloway, B. J. Petersen, and E. W. Boyer (2004), Pre-industrial and contemporary fluxes of nitrogen through rivers: A global assessment based on typology, *Biogeochemistry*, 68, 71-105.
- 6) Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (2015), world fertilizer trends and outlook to 2018. (Available at <http://www.apps.fao.org>)
- 7) 川島博之, 我が国における食料供給と窒素循環, *環境科学学会誌*, Vol. 9, No. 1, pp. 27-33, 1996.
- 8) 環境省, 富栄養化対策の行政対応, pp. 151,
- 9) Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Hellinga, C. & van Kempen, R., Full-scale application of the Sharon process for the treatment of rejection water of digested sludge dewatering, *Water Science & Technology*, Vol. 43, No. 11, pp. 27-134, 2001.
- 10) van Dongen, U., Jetten, M.S.M. & van Loosdrecht, M.C.M., The combined SHARON/Anammox process, IWA Publishing, London, UK., 2001a.
- 11) van Dongen, U., Jetten, M.S.M. & van Loosdrecht, M.C.M. The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater, *Water Science & Technology*, Vol. 44, No. 1, pp. 153-160., 2001b.
- 12) Feyaerts, T., Huybrechts, D. & Dijkmans, R., Best beschikbare technieken voor

mestverwerking. Technical report, Vlaams Instituut voor Technologisch Onderzoek VITO, 2002.

- 13) Kalyuzhnyi, S. & Gladchenko, M., Sequenced anaerobic-aerobic treatment of high strength, strong nitrogenous landfill leachates, *Water Science & Technology*, Vol. 49, No. 5-6, pp. 301-312, 2004.
- 14) Clabaugh, M.M. Nitrification of landfill leachate by biofilm columns, MSc thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA, pp. 43, 2001.
- 15) Ilies, P. & Mavinic, D., The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate, *Water Research*, Vol. 35, pp. 2065-2072, 2001.
- 16) Carrera, J., Baeza, J., Vicent, T. & Lafuente, J., Biological nitrogen removal of high strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system, *Water Research*, Vol. 37, pp. 4211-4221, 2003.
- 17) Keller, J., Subramaniam, K., Gösswein, J. & Greenfield, P., Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors, *Water Science & Technology*, Vol. 35, No. 6, pp. 137-144, 1997.
- 18) Abeling, U. & Seyfried, C.F., Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite, *Water Science & Technology*, Vol. 26, No. 5-6, pp. 1007- 1015, 1992.
- 19) Gil, K.-I. & Choi, E., Nitrogen removal by recycle water nitritation as an attractive alternative for retrofit technologies in municipal wastewater treatment plants, *Water Science & Technology*, Vol. 49, No. 5-6, pp. 39-46, 2004.
- 20) Jenicek, P., Svehla, P., Zabranska, J. & Dohanyos, M., Factors affecting nitrogen removal by nitritation/denitritation, *Water Science & Technology*, Vol. 49, No. 5-6, pp. 73-79, 2004.
- 21) Wyffels, S., Boeckx, P., Pynaert, K., Verstraete, W. & Van Cleemput, O., Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium rich wastewater, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Vol. 78, pp. 412-419, 2003.
- 22) Chen, M., Kim, J.-H., Kishida, N., Nishimura, O. & Sudo, R., Enhanced nitrogen



- removal using C/N load adjustment and real-time control strategy in sequencing batch reactors for swine wastewater treatment, *Water Science & Technology*, Vol. 49, No. 5-6, pp. 309-314, 2004.
- 23) Obaja, D., Macé, S., Costa, J., Sans, C. & Mata-Alvarez, J., Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor, *Bioresource Technology*, Vol. 87, pp. 103-111, 2003.
  - 24) Poo, K., Jun, B., Lee, S., Woo, H. & Kim, C., Treatment of strong nitrogen swine wastewater at full-scale sequencing batch reactor, *Water Science & Technology*, Vol. 49, No. 5-6, pp. 315-323, 2004.
  - 25) Tilche, A., Bacilieri, E., Bortone, G., Malaspina, F., Piccinini, S. & Stante, L., Biological phosphorus and nitrogen removal in a full scale sequencing batch reactor treating piggery wastewater, *Water Science & Technology*, Vol 40, No. 1, pp. 199-206, 1999.
  - 26) Chung, J., Bae, W., Lee, Y., Ko, G., Lee, S. & Park, S., Investigation of the effect of free ammonia concentration upon leachate treatment by shortcut biological nitrogen removal process, In: *IWA Speciality Symposium on Strong Nitrogenous and Agro-Wastewater*, Vol. 1. Seoul, Korea, June 11-13, pp. 93-104, 2003.
  - 27) Jokela, J., Kettunen, R., Sormunen, K. & Rintal, J., Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate: low-cost nitrification in biofilters and laboratory scale in-situ denitrification, *Water Research*, Vol. 36, pp. 4079-4087, 2002.
  - 28) Carucci, A., Chiavola, A., Majone, M. & Rolle, E., Treatment of tannery wastewater in a sequencing batch reactor, *Water Science & Technology*, Vol. 40, No. 1, pp. 253-259, 1999.
  - 29) Murat, S., Insel, G., Artan, N. & Orhon, D., Performance evaluation of SBR treatment for nitrogen removal from tannery wastewater, In: *IWA Speciality Symposium on Strong Nitrogenous and Agro-Wastewater*, Vol. 2. Seoul, Korea, June 11-13, pp. 598-605, 2003.
  - 30) Abeling, U. & Seyfried, C.F., Anaerobic-aerobic treatment of potato-starch wastewater, *Water Science & Technology*, Vol. 28, No. 2, pp. 165-176, 1993.
  - 31) Austermann-Haun, U., Meyer, H., Seyfried, C. & Rosenwinkel, K.-H., Full scale

- experiences with anaerobic/aerobic treatment plants in the food and beverage industry, *Water Science & Technology*, Vol. 40, No. 1, pp. 305-312, 1999.
- 32) Deng Petersen, P., Jensen, K., Lyngsie, P. & Hendrik Johansen, N., Nitrogen removal in industrial wastewater by nitrification and denitrification - 3 years of experience, *Water Science & Technology*, Vol. 47, No. 11, pp. 181-188, 2003.
  - 33) Harmsen, L.W.F., Lourens, P.A. & Van Leeuwen, H.J.M.L, Stikstofverbindingen verwijderen uit afvalwater, *Procestechiek*, 41, 27-29, 1986. (In Dutch).
  - 34) Pynaert, K., Nitrogen removal in wastewater treatment by means of oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification, PhD thesis, Ghent University, Faculty of Applied Biological Sciences, pp 179, 2003.
  - 35) Hellinga C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J., The Sharon process for nitrogen removal in ammonium rich wastewater, *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen, University Gent*, Vol. 62, No. 4b, pp. 1743-1750, 1997.
  - 36) Hanaki, K., Wantawin, C. & Ohgaki, S., Nitrification at low-levels of dissolved-oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor, *Water Research*, Vol. 24, pp. 297-302, 1990.
  - 37) Abeliovich, A., Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. *Applied Environmental and Microbiology*, Vol. 53, pp. 754-760, 1987.
  - 38) Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., and Srinath E.G., Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *Journal of Water Pollution Control Federation*, Vol. 48, No. 5, pp. 835-852, 1976.
  - 39) Strous M., Van Gerven E., Zheng P., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reaction configurations, *Water Research*, Vol. 31, pp. 1955-1962, 1997.
  - 40) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.K., Jetten, M.S.M., The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.50, No.5, pp.589-596, 1998.
  - 41) Hippen A., Rosenwinkel K.H., Baumgarten G., Seyfried C.F., Aerobic

- deammonification: a new experience in the treatment of wastewater, *Water Science and Technology*, Vol. 35, No. 10, pp. 111-120, 1997.
- 42) Wett B., Development and implementation of a robust deammonification process, *Water Science and Technology*, Vol. 56, No. 7, pp. 81-88, 2007.
  - 43) Third K.A., Sliekers A.O., Kuenen J.G., Jetten M.S., The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 24, No.4, pp. 588-596, 2001.
  - 44) Sliekers A.O., Third K.A., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., CANON and Anammox in a gas-lift reactor,” *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 218, pp. 339-344, 2003.
  - 45) Kuai, L. and Verstraete W., Ammonium removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 11, pp. 4500-4506, 1998.
  - 46) Pynaert, K., Smets B.F., Wyffels S., Beheydt D., Siciliano S.D., and Verstraete W., Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 6, pp. 3626-3635, 2003.
  - 47) Van Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Sinninghe Damsté, J.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. & Strous, M., The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 233, pp. 7-13, 2004.
  - 48) Hu B.L., Shen L.D., Xu X.Y., Zheng P., Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems, *Biochemical Society Transactions*, Vol.39, No.6, pp.1181-1186, 2011.
  - 49) Kuypers M.M.M., Lavik G., Woebken D., et al., Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the National America*, Vol.102, No.18, pp.6478-6483, 2005.
  - 50) Schmid M.C., Risgaard-Petersen N., van de Vossenberg J., et al., Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity, *Environmental Microbiology*, Vol.9, No.6, pp.1476-1484, 2007.

- 51) Penton C. R., Devol A.H., and Tiedje J.M., Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium –oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.72, No.10, pp.6829-6832, 2006.
- 52) Strous M., Fuerst E. A., Kramer E. H. M., et al., Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, Vol.400, No.6743, pp.446-449, 1999.
- 53) Kartal B., van Niftrik L., Rattray J., et al., *Candidatus* “Brocadia fulgida”: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol.63, No.1, pp.46-55, 2008.
- 54) Schmid M., Twachtman U., Klein M., et al., Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol.23, No.1, pp.93-106, 2000.
- 55) Schmid M., Walsh K., Webb R., et al., *Candidatus* “Scalindua brodae”, sp. Nov., *Candidatus* “Scalindua wagneri”, sp. nov., Two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol.26, No.4, pp.6529-538, 2003.
- 56) Kartal B., Rattray J., van Niftrik L., A., et al., *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol.30, No.1, pp.39-49, 2007.
- 57) Quan Z. X., Rhee S. K., Zuo J. E., et al., Diversity of ammonium-oxidizing (anammox) reactor, *Environmental Microbiology*, Vol.10, No.11, pp.3130-3139, 2005.
- 58) Dalsgaard T., Canfield D.E., Petersen J., Thamdrup B, and Acuña-González, N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica, *Nature*, Vol. 422, pp. 606-608, 2003.
- 59) Kuypers M.M., Sliekers A.O., Lavik G., Schmid M., Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Sinninghe Damste J.S., Strous M., and Jetten M.S., Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, Vol. 422, pp. 608-611, 2003.

- 60) Amano T., Yoshinaga I., Okada K., Yamagishi T., Ueda S., Obuchi A., et al.,  
Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria –related 16S  
rRNA genes in coastal marine sediment in Japan, *Microbes and Environments*, Vol.  
22, No. 3, pp. 232-242, 2007.
- 61) Kartal B., de Almeida N.M., Maalcke W.J., Op den Camp. H.J.M., Jetten M.S.M.,  
and Keltjens J.T., How to make a living from anaerobic ammonium oxidation,  
*FEMS Microbiology Review*, Vol. 37, No. 3, pp. 428-461, 2013.
- 62) 金田一智規, 海洋由来 Anammox 細菌に関する研究動向, *水環境学会誌*, Vol.  
37(A), No. 9, pp.321-324, 2014.
- 63) Kartal B., Koleva M., Arsov R., van de Star W., Jetten M.S.M., and Strous M.,  
Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater,  
*Journal of Biotechnology*, Vol. 4, No. 18, pp. 546-553, 2006.
- 64) Oshiki M., Awata T., Kindaichi T., Satoh H., and Okabe S., Cultivation of  
planktonic anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria using membrane  
bioreactor, *Microbes and Environments*, Vol. 28, No. 4, pp. 436-443, 2013.
- 65) Awata T., Oshiki M., Kindaichi T., Ozaki N., Ohashi A., and Okabe S.,  
Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium  
belonging to the “*Candidatus scalindua*” group, *Applied Environmental  
Microbiology*, Vol. 79, No. 13, pp. 4145-4148, 2013.
- 66) Fux c., Marchesi V., Brunner I., Siegrist H., Anaerobic ammonium oxidation of  
ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors, *Water Science and  
Technology*, Vol. 49, No. 11-12, pp. 77-82, 2004.
- 67) Oshiki M., Shimokama M., Fujii N., Satoh H., and Okabe S., Physiological  
characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium “*Candidatus  
Brocadia sinica*.”, *Microbiology*, Vol. 157, pp. 1703-1703, 2011.
- 68) Isaka K., date Y., Sumino T., Yoshie S., and Tsuneda, Growth characteristic of  
anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor,  
*Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 70, No. 1, pp. 47-52, 2006.

## 第3章

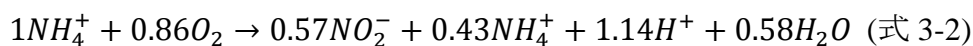
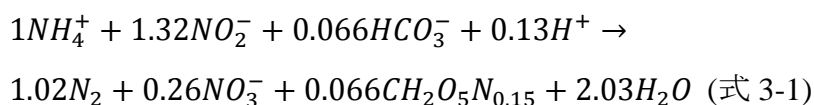
### 酸素制御による部分的亜硝酸化の実現と維持

#### 3.1 はじめに

窒素・リンに起因する富栄養化の影響によって形成された貧酸素化した海域は全世界において1960年の10箇所から2008年の405箇所に増えてきている<sup>1,2)</sup>。全窒素および全リンに関して平成23年度の我が国の公共用水域における水質汚濁の現状によれば湖沼の環境基準達成率は、全窒素が12.8%、全リンが51.3%であった。東京湾、伊勢湾、大阪湾などでは達成率が低く<sup>3)</sup>、またこれらの閉鎖性水域は総量削減の規制対象であるため、環境中に流入する窒素やリンの適切な削減対策が急務とされている<sup>4)</sup>。

窒素除去に関して現在下水処理場などでは生物学的硝化脱窒法が主に用いられている。しかし従来の硝化と脱窒を組み合わせたプロセスでは、酸素の供給や硝化液の循環のためエネルギー消費量が大きいこと、脱窒効率が循環比に依存すること、電子供与体として有機物添加が必要であることなどから、処理費用の増大が問題になっており、高効率かつ低コストの生物学的窒素除去手法の開発が求められている<sup>5)</sup>。

C/N比の低い排水に対応した省エネルギー型の新たな窒素除去方法として、独立栄養細菌による嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)反応を利用した技術が注目され、近年多くの研究成果が報告されている<sup>6)</sup>。その代謝反応は式(3-1)で示されるように、1molのアンモニア性窒素( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )に対して1.32molの亜硝酸性窒素( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )が反応するため<sup>7)</sup>、運転制御しやすい二槽式アナモックスプロセスで排水を処理するには、排水に含まれる $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の約57%を $\text{NO}_2^-\text{-N}$ に酸化し(式3-2)<sup>8)</sup>、流出水中の $\text{NO}_2^-\text{-N}/\text{NH}_4^+\text{-N}$ 比( $N_R$ )を約1.32に制御する部分的亜硝酸化の前処理が必要となる。



窒素含有排水の部分的亜硝酸化処理に関しては、まず硝化反応を  $\text{NO}_2^-$  にまで制御するため、アンモニア酸化細菌(Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB)と亜硝酸酸化細菌(Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB)の酸素親和性、温度や pH 条件による増殖速度の違い、遊離アンモニア(Free Ammonia, FA)と遊離亜硝酸(Free Nitrous Acid, FNA)に対する感受性の違いを利用することで槽内に AOB を集積し、NOB をウォッシュアウトさせる必要がある<sup>9)</sup>。これらの原理を利用し、意図的に窒素負荷、曝気量、溶存酸素濃度、アルカリ度などの因子を調整し、 $\text{NH}_4^+$  の 57% を  $\text{NO}_2^-$  に酸化させる。これまでの二槽式アナモックスプロセスの前処理に関する研究では、一部の原水の  $\text{NH}_4^+$  を完全に  $\text{NO}_2^-$  に酸化し、その処理水とバイパスさせた残りの原水を混合することによって  $\text{N}_\text{R}$  を調整する方法も行われている<sup>10)</sup>。しかし、この方法は調整槽が必要となり設置のためのコストおよび敷地が必要となる。上記の点を改善するには、一槽で原水の  $\text{NH}_4^+$  の 57% を  $\text{NO}_2^-$  に部分的亜硝酸化する必要があるが、その運転制御方法に関する報告は少ない。

これまでの部分的亜硝酸化の研究は CSTR(Continuous Stirred-Tank Reactor), SBR(Sequencing Batch Reactor), MBR(Membrane Bioreactor)が用いられている<sup>11)~16)</sup>。しかし生物膜システムでは汚泥滞留時間(Sludge Retention Time, SRT)のコントロールが難しいため、MBR を用いた場合長時間の亜硝酸化を維持できないと言われており、部分的亜硝酸化の実際の処理については CSTR あるいは SBR 懸濁型汚泥システムが適していると言われている<sup>15)</sup>。

CSTR による部分的亜硝酸化では 1~2 日の短い SRT のため大量の汚泥が流失したり、 $30^\circ\text{C}$ ~ $35^\circ\text{C}$  に制御するため、リアクターの加温や槽内の曝気動力によりコストが高くなることが問題である。そこでエネルギーを削減できる方法として適切な DO 濃度を制御することは省エネルギー化および低コスト化に向けて有効な手法であると考えられる。

そこで本研究は、低コストかつ安定した部分的亜硝酸化の実現および維持が可能な運転制御方法を明らかにすることを目的として、CSTR を用いた硝化反応実験を行い、段階的に DO 濃度を変化させたときの硝化反応における亜硝酸化率および流出水の  $\text{N}_\text{R}$  の変化などに関して検討を行った。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 実験装置および実験条件

図 3-1 に本研究に用いた実験装置の概略を示す。リアクターはアクリル製であり、CSTR 硝化槽と沈殿槽からなり、それぞれの有効容積は 8L と 2L である。底部に設置した散気管により曝気を行いリアクターの攪拌を行った。温度はリアクターの中に投込み型ヒーターを投入して直接加温することで 25℃前後に制御した。水理学的滞留時間(Hydraulic Retention Time, HRT)は 12 時間とし、基質はローラーチューブポンプを用いて連続的に投入した。

### 3.2.2 基質組成

本研究に用いた基質は服部ら<sup>17)</sup>の窒素含有排水を参考とし、その組成を表 3-1 に示した。C/N 比の低い排水には代表的なものとして埋立地浸出水、汚泥消化返流水、メタン発酵プラントの脱水ろ液などが挙げられる。これらの排水中の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度は 160-1500mg/L、COD 濃度は 700-1400mg/L であるが<sup>18)~21)</sup>、その有機物の BOD は低いため、微生物による利用が難しいと考えられ、本研究では基質中に有機物の添加は行わなかった。人工排水の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度は 250mgN/L とし、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の容積負荷(Nitrogen Loading Rate, NLR)を  $0.5\text{kgN/m}^3 \cdot \text{d}$  とした。NLR は以下の式-2a に従って算出した。基質の pH は 8.0~8.5 である。

### 3.2.3 種汚泥

種汚泥は S 浄化センターの曝気槽から採取した活性汚泥を用いた。実験初期の MLVSS 濃度は約 2000 mg/L であった。この活性汚泥は一定の硝化能力があり、高濃度の基質を連続的に投入することで、硝化細菌の馴養を行った。硝化細菌は独立栄養性であり、増殖速度が低いため、リアクターの汚泥濃度を維持するため、分析以外に人為的に汚泥の引き抜きは行わなかった。

### 3.2.4 運転条件

部分的亜硝酸化の実現および維持を検討するため、DO 濃度および曝気量 (AR)を段階的に変化させた。設定した DO 濃度と AR により実験期間を 7 段階(フェーズ I ~VII)に分けた。フェーズ I は AOB を主体とする硝化汚泥の集積を目的



としたスタートアップ期間であり、NOB の増殖を防止するため、実験開始直後の DO 濃度は約 0.80mg/L に制御した。各フェーズの DO 濃度および AR を表 3-2 に示す。

### 3.2.5 測定項目と分析方法

水質分析は基質の人工排水とリアクターの処理水について行った。測定試料は Millipore 社製の 0.45 $\mu$ m のフィルターを通したものに対して、キャピラリー電気泳動分析器(Agilent 7100)により各態窒素濃度を測定した<sup>22)</sup>。

MLVSS は下水試験方法 23)に従い測定した。pH は pH メーター(笠原、KP-10Z)を用いて測定した。DO および温度は TOA-DKK 社製のポータブル溶存酸素計(DO-31P)により測定した。亜硝酸塩蓄積率(NAR), FA および FNA<sup>24)</sup>, アンモニア除去速度(ARR), アンモニア酸化活性(AOA), 亜硝酸化率は式(3-3)~(3-8)に従って計算した。

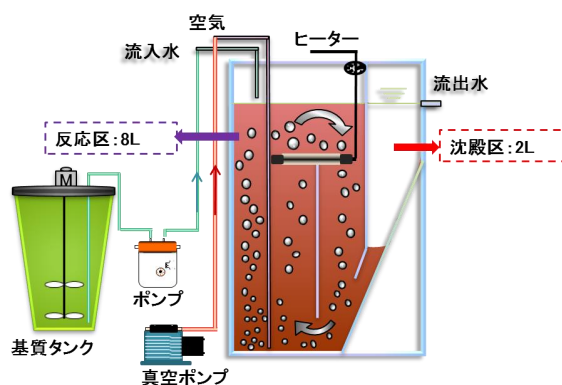


図 3-1 実験装置の概略図

表 3-1 基質組成

	成分	濃度(g/L)
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	1.414
	NaHCO <sub>3</sub>	1.500
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.081
無機塩	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O	0.214
	CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.036
	MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.051
	Na <sub>2</sub> ・EDTA・2H <sub>2</sub> O	8.304
栄養塩	FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	5.000
	ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.215
	CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.120
	MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.495
	CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.125
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.110
	NiCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.095
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0.078
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.007

表 3-2 連続実験の運転条件

フェーズ	期間(d)	DO(mg/L)	AR(L/min)
I	1-34	<0.80	--
II	35-86	0.08±0.05	--
III	87-135	0.12±0.03	--
IV	136-211	0.20±0.05	--
V	212-235	0.17±0.03	1.75
VI	236-264	--	1.5
VII	265-280	--	1.25

$$\text{NAR} = \frac{\text{流出}[NO_2^- - N]}{\text{流出}([NO_2^- - N] + [NO_3^- - N])} \times 100\% \quad (\text{式 3-3})$$

$$\text{FA} = \frac{17}{14} \times \frac{[NH_4^+ - N] \times 10^{pH}}{e^{[6334/(273+T)]} + 10^{pH}} \quad (\text{式 3-4})$$

$$\text{FNA} = \frac{47}{14} \times \frac{[NO_2^- - N]}{e^{[-2300/(273+T)]} \times 10^{pH} + 1} \quad (\text{式 3-5})$$

$$\text{ARR} = \frac{\text{流入}[NH_4^+ - N] - \text{流出}[NH_4^+ - N]}{\text{流入}[NH_4^+ - N] \times \text{HRT}} \quad (\text{式 3-6})$$

$$\text{AOA} = \frac{\text{流入}[NH_4^+ - N] - \text{流出}[NH_4^+ - N]}{\text{流入}[NH_4^+ - N] \times \text{HRT} \times \text{MLVSS}} \times 100\% \quad (\text{式 3-7})$$

$$\text{亜硝酸化率} = \frac{\text{流出}[NO_2^- - N]}{\text{流入}[NH_4^+ - N]} \times 100\% \quad (\text{式 3-8})$$

### 3.3 実験結果および考察

#### 3.3.1 部分的亜硝酸化の実現

リアクターのスタートアップ期間(1~34 日目)における DO, pH, NAR および各態窒素, FA, FNA 濃度の経日変化を図 3-2 に示す. 運転開始直後から硝化反応の進行が見られた. 式(1b)に示した通り, 硝化反応においてはアルカリ度を消費するため, 硝化反応の進行とともに流出水の pH が次第に低下した. 実験開始後の 7 日間で,  $\text{NO}_2^-$ -N の蓄積率は 86.7% から 97.2% に上昇し, 100% に近い NAR が得られた. 流出水の NAR は 50% 以上になると亜硝酸化が実現されたと判断できるため<sup>25)</sup>, スタートアップ直後から亜硝酸化は実現したと言える.

21~34 日目において DO 濃度の変動とともに, pH は 7.70 から 8.31 に上昇, 流出水の  $\text{NH}_4^+$ -N 濃度が 102.6mg/L に上昇,  $\text{NO}_2^-$ -N 濃度は 113.4mg/L に低下し, 34 日目に約 50% の部分的亜硝酸化を実現することができた.

#### 3.3.2 部分的亜硝酸化の制御

部分的亜硝酸化の達成後, 理想的な部分的亜硝酸化を長期間維持させる制御方法を検討するため, フェーズ II~V において DO 濃度, フェーズ V~VII において曝気量が及ぼす部分的亜硝酸化の制御に与える影響を考察した. 各フェーズにおけるリアクター内の DO 濃度および pH の経日変化を図 3-3 に示した. またスタートアップ後の各フェーズにおける亜硝酸化性能の経日変化を図 3-3 に, FA と FNA 濃度の経日変化を図 3-4 に示した.

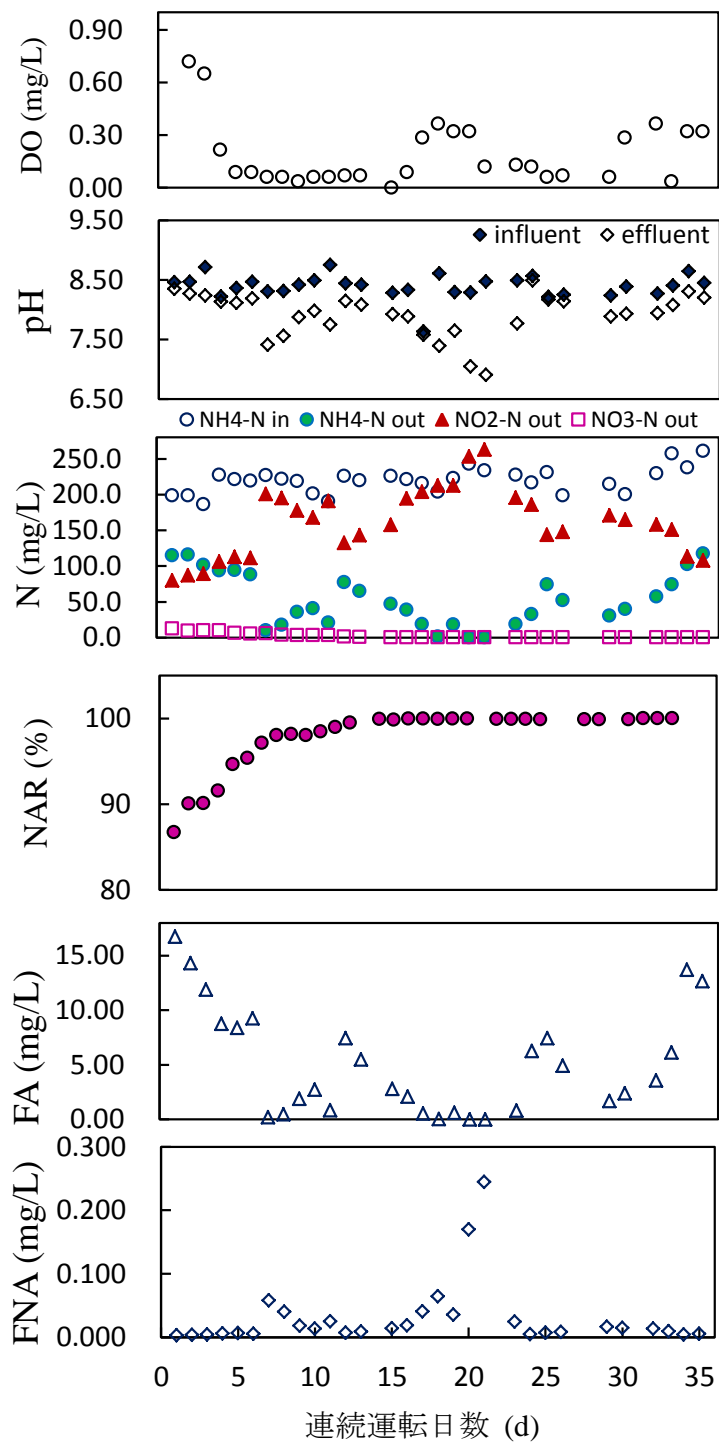


図 3-2 スタートアップ期間における DO, pH, NAR および  
各態窒素, FA, FNA 濃度の経日変化

## 1) DO 濃度変動の影響

フェーズⅡからフェーズⅤの各フェーズにおける DO 濃度および  $N_R$  の平均値を表 3-3 にまとめた。これらの結果より、曝気量を調整し、DO 濃度を 0.12~0.17mg/L 程度に制御することで、FA 濃度は平均 5.1mg/L~11.4mg/L, FNA 濃度が平均 0.009mg/L~0.0014 mg/L となり、FA と FNA 濃度による AOB 活性への阻害を防止することができるため、理想的な部分的亜硝酸化を維持することが可能であると考えられる。

表 3-3 フェーズⅡ～Ⅴの DO, FA, FNA 濃度  
および  $N_R$  の平均値

フェーズ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
DO(mg/L)	0.08±0.05	0.12±0.03	0.20±0.05	0.17±0.03
FA(mg/L)	15.6±6.0	11.4±4.8	3.8±1.7	5.1±0.9
FNA(mg/L)	0.005±0.002	0.009±0.003	0.021±0.006	0.014±0.002
$N_R(-)$	0.85±0.36	1.32±0.26	2.19±0.67	1.44±0.15

## 2) 曝気量変動の影響

本研究では酸素の制御を容易にするために、フェーズⅤ～Ⅶの期間において流量計により曝気量をそれぞれ 1.75L/min, 1.5L/min, 1.25L/min に制御した。曝気量を制御したフェーズⅤ～Ⅶにおける AR, FA, FNA 濃度および  $N_R$  を表 3-4 にまとめた。フェーズⅤ, Ⅵ, Ⅶにおいて曝気量を 1.75L/min から, 1.5L/min, 1.25L/min に減少させるとともに, ARR が低下したため,  $N_R$  の平均値はそれぞれ 1.44, 1.21, 0.64 となった。271 日目に曝気量を 2.0L/min に急増させた際の

表 3-4 フェーズⅡ～Ⅴにおける AR, FA, FNA 濃度および  $N_R$  の平均値

フェーズ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	271 日目
AR(L/min)	1.75	1.5	1.25	2.0
FA(mg/L)	5.1±0.9	5.4±0.86	9.0±1.56	3.92
FNA(mg/L)	0.014±0.002	0.012±0.002	0.006±0.001	0.008
$N_R(-)$	1.44±0.15	1.21±0.18	0.64±0.05	2.0

$N_R$  は 2.0 であった。フェーズⅤおよびフェーズⅥではそれぞれ 25 日間と 19 日間理想的な部分的亜硝酸化を維持することができた。以上のことから曝気量を 1.5~1.75L/min に制御することで、FA 濃度は平均 5.1mg/L~5.4mg/L, FNA 濃度は平均 0.012mg/L~0.0014 mg/L となり、FA と FNA による AOB 活性への阻害を防止することができ、理想的な部分的亜硝酸化を長期間維持することが可能であると考えられる。

### 3) 本研究と既往研究の比較の考察

表 3-5 に本研究とこれまでの部分的亜硝酸化の既往研究の結果を比較した。SBR や SHARON プロセスに比べて本研究では低い DO 濃度によって理想的な部分的亜硝酸化を実現することができた。Yang ら<sup>27)</sup>は CSTR を用いて消化液を対象に亜硝酸化率に及ぼす NLR の影響を検討した結果、DO 濃度を 0 付近に維持することで約 50%の亜硝酸化が可能であることを示しており、本研究結果と概ね一致した。本研究および Yang らの結果は CSTR を用いることで他のリアクターに比べて曝気量の削減が可能となり、省エネルギー化が図れることを示している。

表 3-5 本研究と既往研究の比較

リアクター	NLR (kgN/m <sup>3</sup> /d)	NAR (%)	亜硝酸化率 (%)	DO (mg/L)	pH
本研究 (フェーズⅢ)	0.5	>98	57	0.12	8.08
揺動床 <sup>14)</sup>	1.9	>95	47.4	2.2~10.2	7.6
SBR <sup>28)</sup>	2.4		45.8	3	6.5~8
SHARON <sup>11)</sup>	0.8	--	43.8	3	6.5~7.5
CSTR <sup>29)</sup>	4.2	>98	47.4	≈0	7.6

### 3.4 結論

流入水の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度を 250mg/L, リアクターの温度を 25°C 前後に制御して部分的亜硝酸化反応の連続実験を行った結果, 以下の結論が得られた.

- (1) DO 濃度を 0.80mg/L 以下に制御し, FA 濃度を 0.10mg/L 以上にすることで, NOB の活性が阻害され, 280 日間の亜硝酸化の実現および維持が可能であった.
- (2) DO 濃度を 0.12mg/L に制御することで理想的な部分的亜硝酸化が実現され, 約 50 日間維持することができた. この時のリアクター内の FA と FNA 濃度はそれぞれ 11.4mg/L と 0.009mg/L であった.
- (3) DO 濃度や曝気量の変化により亜硝酸化率が変動し, FA と FNA 濃度も変化するため, DO は亜硝酸化率を左右する重要な制御因子であると考えられる.

### 第 3 章 参考文献

- 1) Diaz, R.J. and Rosenberg, R., Spreading dead zone and consequences for marine ecosystems, *Science*, Vol.321, No.5891, pp.926-929, 2008.
- 2) Selman, M., Sugg, Z., Greenhalgh, S., Diaz, R., Eutrophication and hypoxia in coastal areas: A global assessment of the state of knowledge, *Water Quality: eutrophication and hypoxia policy note series* No. 1, Washington, DC, 2008: World Resources Institute.
- 3) 環境省, 水・大気環境局, 平成 23 年度公共用水域水質測定結果, 平成 24 年 12 月, 環境省ホームページ <https://www.env.go.jp/water/suiiki/h23/full.pdf>
- 4) 環境省, 第七次総量削減, 平成 23 年 6 月, <https://www.env.go.jp/water/heisa/tplc.html>
- 5) 藤井隆夫, 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化その基礎と応用, *化学と生物*, Vol. 48, No. 3, pp. 163-169, 2010.
- 6) Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.K., Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol.16, No.3, pp.177-183, 1995.
- 7) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.K., Jetten, M.S.M., The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.50, No.5, pp.589-596, 1998.
- 8) Wiesmann, U., Biological nitrogen removal from wastewater, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.51, pp.113-154, 1994.
- 9) Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S., Biological removal of nitrogen from wastewater, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.192, pp.159-195, 2008.
- 10) 高木啓太, 奥田正彦, 糸川浩紀, 中沢均, 古川憲治. アナモックスプロセスにおける固定床型反応槽を用いた部分亜硝酸化処理の安定制御, *生物工学誌*, Vol.89, No.9, pp.514-519, 2011.
- 11) Hellings, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen,



- J.J., The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater, *Water Science & Technology*, Vol.37, No.9, pp.135-142, 1998.
- 12) Mosquera-Corral, A., González, F., Campos, J.L., Méndez, R., Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds, *Process Biochemistry*, Vol.40, No.9, pp.3109-3118, 2005
  - 13) Magrí, A., Corominas, L., López, H., Campos, E., Balaguer, M., Colprim, J., Flotats, X., A Model for the Simulation of the SHARON Process: pH as a Key Factor, *Environmental Technology*, Vol.28, No.3, pp.255-265, 2007.
  - 14) Yamamoto, T., Takaki, K., Koyama, T., Furukawa, K., Novel partial nitrification treatment for anaerobic digestion liquor of swine wastewater using swim-bed technology, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.102, No.6, pp.497-503, 2006.
  - 15) Fux, C, Huang, D, Monti, A, Siegrist, H., Difficulties in maintaining long-term partial nitritation of ammonium-rich sludge digester liquids in a moving-bed biofilm reactor (MBBR), *Water Science & Technology*, Vol.49, No.11-12, pp.53-60, 2004.
  - 16) van Dongen, U., Jetten, M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M., The combined Sharon/Anammox process London, UK: STOWA Report IWA Publishing, 2001.
  - 17) 服部賢, 小地沢俊宏, 渡辺悠介, タンドカール マダン, 久保田健吾, 李玉友, 原田秀樹, DHS リアクターによる無曝気方式硝化プロセスの処理特性, *環境工学研究論文集*, Vol.45, pp.317-324, 2008.
  - 18) Arnold, E., Böhm, B., Wilderer, P.A., Application of activated sludge and biofilm sequencing batch technology to treat reject water from sludge and dewatering systems: a comparison, *Water Science & Technology*, Vol.41, No.1, pp.115-122, 2000.
  - 19) Jenicek, P., Svehla, P., Zabranska, J., Dohanyos, M., Factors affecting nitrogen removal by nitritation/denitritation, *Water Science & Technology*, Vol.49, No.5-6, pp.73-79, 2004.
  - 20) Jokela, J.P.Y., Kettunen, R.H., Sormunen, K.M., Rintal, J.A., Biological nitrogen

removal from municipal landfill leachate: low-cost nitrification in biofilters and laboratory scale in-situ denitrification, *Water Research*, Vol. 36, pp. 4079-4087, 2002.

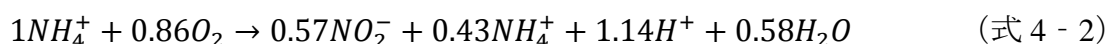
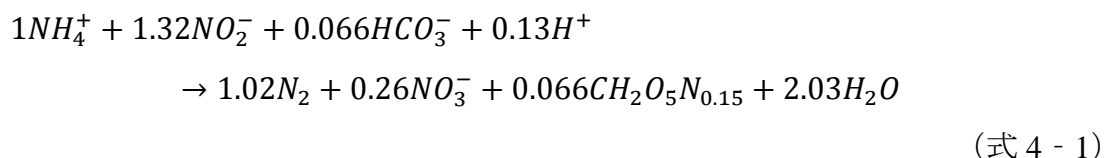
- 21) Laurich, F., Gunner, C., The store and treat process for sludge liquor management, *Water Science & Technology*, Vol.42, No.12, pp.269-275, 2003.
- 22) Vilas-Cruz, M., Go´mez, J., Me´ndez, R., and Lema, J. M., Simultaneous determination of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in wastewater by capillary electrophoresis. Proc., III Int. Symp. of Analytical Methodology for the Environment, Vol. II, Association of Environmental Science and Techniques, Barcelona, Spain, pp.1-50, 1994 (in Spanish).
- 23) 日本下水道協会, 下水試験方法 上巻, 日本下水道協会, 東京, 1999.
- 24) Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.S., Srinath, E.G., Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *Water Pollution Control Federation*, Vol.48, No.11, pp.835-852, 1976.
- 25) Yuan, L., Peng, D., Wang, Z., Biological nitrogen removal by shortcut nitrification-denitrification, *China Water & Wastewater*, Vol.16, No.2, pp.29-31, 2000.
- 26) Jiménez, E., Giménez, J.B., Seco, A., Ferrer, J., Serralt, J., Effect of pH, substrate and free nitrous acid concentrations on ammonium oxidation rate, *Bioresource Technology*, Vol.124, pp.478-484, 2012.
- 27) Fux, C., Lange, K., Faessler, A., Huber, P., Grueniger, B., Siegrist, H., Nitrogen removal from digester supernatant via nitrite-SBR or SHARON, *Water Science & Technology*, Vol.48, No.8, pp.9-18, 2003.
- 28) Galí, A., Dosta, J., van Loosdrecht, M.C.M., Mata-Alvarez, J., Two ways to achieve an anammxo influent from real reject water treatment at lab-scale: Partial SBR nitrification and SHARON process, *Process Biochemistry*, Vol.42, pp.715-720, 2007.
- 29) Yang, J., Zhang, L., Daisuke, H., Takahiro, S., Ma, Y., Li, Z., Furukawa, K., High rate partial nitrification treatment of reject wastewater, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.110, No.4, pp.436-440, 2010.

## 第 4 章

### 部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 反応への転換

#### 4.1 はじめに

Anammox を核とした排水処理プロセスは、排水中の  $\text{NH}_4^+$  の約 60% を部分的に亜硝酸に酸化するという(1)部分的亜硝酸化プロセス (式 4 - 1) <sup>1)</sup> により生成した  $\text{NO}_2^-$  と残留した  $\text{NH}_4^+$  を窒素ガスに変換する(2)Anammox プロセス (式 4 - 2) <sup>2)</sup> によって構成される。この二つのプロセスを同一水槽で同時に行う手法と二つの反応槽で行う手法とでは異なる名前が提案されている <sup>3)</sup>。典型的な二槽式 Anammox に関する Dongen ら <sup>4)</sup> は SHARON-Anammox プロセス、古川ら <sup>5)</sup> あるいは徳富ら <sup>6)</sup>、高木ら <sup>7)</sup> によって Partial Nitritation-Anammox の処理する方式が提案されている。Anammox 細菌の基質として  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  と  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  が 1:1.32 のモル比で反応されるので、二槽式プロセスにおいては Anammox 反応の前処理として部分的亜硝酸化の実現と運転制御が重要な研究テーマである。



一方で最近の報告 <sup>8)</sup> によれば Anammox の実用化プロセス全体の 88% が一槽式を採用しており、一槽式 Anammox が主流となっている。日本国内において古川ら <sup>9)</sup> は網目状のアクリル繊維担体に付着固定化した硝化活性汚泥の内部に Anammox 細菌を増殖させ、一槽式 Anammox により窒素の除去可能であることが報告し、Single stage Nitrogen removal using Anammox and Partial nitritation (SNAP) と命名した。海外においては、DEMON 法 <sup>10,11)</sup> (aerobic/anoxic deammonification), CANON 法 <sup>12,13)</sup> (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) あるいは OLAND 法 <sup>14,15)</sup> (Oxygen Limited autotrophic Nitrification-Denitrification) といわれる一槽式 Anammox 処理法が提案されてい

る。これらの異なる処理プロセスは基本的に同じな原理であり大差はない。DEMON 法および OLAND 法において窒素の除去は硝化細菌により行われるという仮説があったが、近年諸多研究者<sup>15,16)</sup>は FISH 分析法を用いて菌叢解析した結果、各異なる名前の一槽式 Anammox プロセスにおける窒素除去が Anammox 細菌による行われたことが確認された。Lieu ら<sup>17)</sup>は部分的亜硝酸化工程で Anammox 反応が自然に発生すると報告している。我々は、CSTR を用いて Anammox 処理の前処理である部分的亜硝酸化について研究を行ったが、長期間の部分的亜硝酸化の維持ができた上で、窒素消失が発見された。

本研究では CSTR による部分的亜硝酸化（Phase I）から連続型一槽式部分的亜硝酸化-Anammox 法（Phase II）への転換の基礎的考察を行い、窒素除去率に影響を与える運転制御因子について検討した。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 実験装置および実験条件

図 4-1 に示した連続式リアクターを用いて実験を行い、リアクターの有効容積が 5L であり、反応槽温度は 25℃前後に制御した。水理学的滞留時間は 12 時間とし、pH は 8.0~8.5 であった。運転期間中、リアクターの底部に設置した散気管により曝気と攪拌を行った。本研究に用いた人工廃水の組成は第三章と同様であった。単一な窒素源である  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度は 250mgN/L とし、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の容

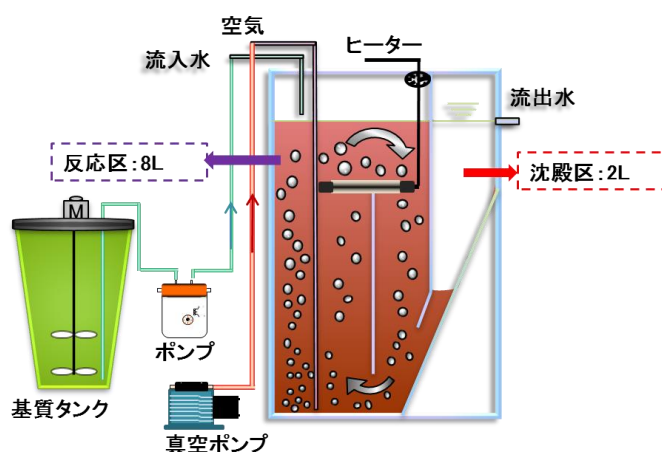


図 4-1 実験装置の概略図

積負荷(NLR)を  $0.5\text{kgN/m}^3\cdot\text{d}$  とした.  $\text{NaHCO}_3$  を  $1500\text{mg/L}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を  $81\text{mg/L}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を  $214\text{mg/L}$ ,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を  $36\text{mg/L}$ ,  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を  $51\text{mg/L}$  とし, 人工排水の pH は  $8.0\sim 8.5$  である.

#### 4.2.2 測定項目と分析方法

水質分析は基質の人工排水とリアクターの処理水について行った. 測定試料は Millipore 社製の  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターを通したもののに対して, キャピラリー電気泳動分析器(Agilent 7100)により各態窒素濃度を測定した<sup>22)</sup>. MLVSS は下水試験方法<sup>18)</sup>に従い測定した. pH は pH メーター(笠原、KP-10Z)を用いて測定した. DO および温度は TOA-DKK 社製のポータブル溶存酸素計(DO-31P)により測定した. 遊離アンモニア (FA) 濃度, 遊離亜硝酸 (FNA) 濃度<sup>19)</sup>および窒素除去率 (NRE) は(式 4-3)~(式 4-5)に従って計算した.

$$\text{FA} = \frac{17}{14} \times \frac{[\text{NH}_4^+ - \text{N}] \times 10^{\text{pH}}}{e^{[6334/(273+T)]} + 10^{\text{pH}}} \quad (\text{式 4-3})$$

$$\text{FNA} = \frac{47}{14} \times \frac{[\text{NO}_2^- - \text{N}]}{e^{[-2300/(273+T)]} \times 10^{\text{pH}+1}} \quad (\text{式 4-4})$$

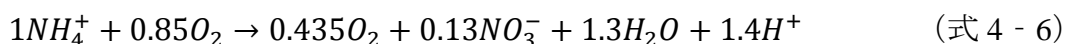
$$\text{NRE} = \frac{\text{流入}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] - (\text{流出}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] - \text{流出}[\text{NO}_2^- - \text{N}] - \text{流出}[\text{NO}_3^- - \text{N}])}{\text{流入}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] \times \text{HRT}} \quad (\text{式 4-5})$$

### 4.3 実験結果および考察

#### 4.3.1 部分的亜硝酸化条件の確立と長期運転における Anammox 反応

第三章の結果による 242 日目以前の部分的亜硝酸化期間において, 流入水中に含まれる窒素の大量消失が見られなかった. しかしその後, 図 4-2 運転期間における DO 濃度, AR, 各態窒素濃度,  $\text{NO}_3^- - \text{N} / \Delta \text{NH}_4^+ - \text{N}$  の推移および窒素除去率の経日変化に示したように, 242 日~264 日の Anammox 反応に適した部分的亜硝酸化状態における, NRE は 1.5% から 18.3% に顕著的に上昇して推移し, 平均的に 13.3% の窒素除去が見られた. 242 日~264 日において一槽式 Anammox 反応特有の  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  の生成量と  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  の減少量の比は平均的に 0.03 であった.

式 4 - 6 からの推定値として 0.13 より低いレベルであった.



#### 4.3.2 Anammox 反応への転換

265 日目以前の期間においてリアクターは当初部分的亜硝酸の実現と維持することを目的として運転したが図らずも部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 細菌が増殖し、窒素の除去が見られ、既往研究で提案されているような一槽式 Anammox プロセスとして機能することになった.

曝気量を変化した結果, Stage1 の NRE は平均的に 24.6%に増加した.  $\text{NO}_3^-$ -N

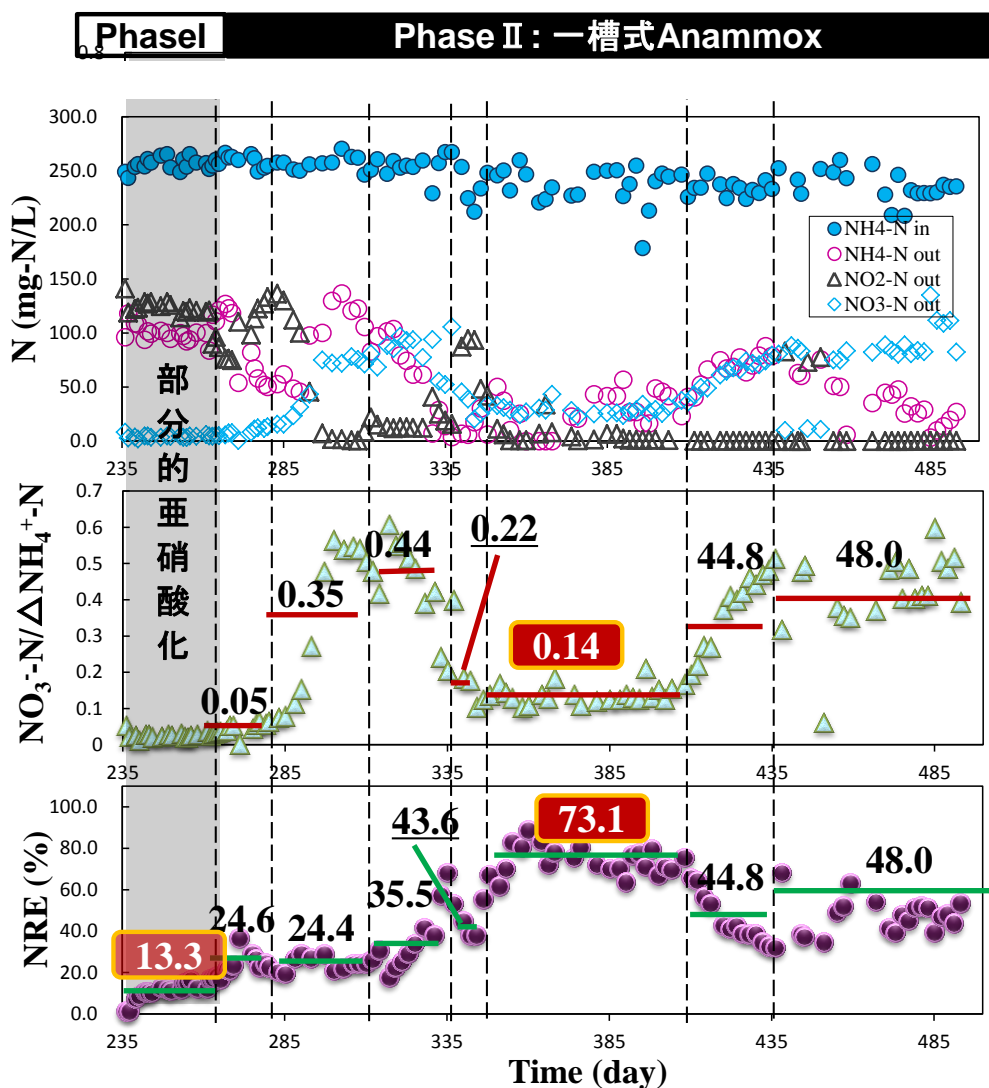


図 4-2 運転期間における各態窒素濃度,  $\text{NO}_3^-$ -N/ $\Delta\text{NH}_4^+$ -N の推移および窒素除去率の経日変化

の生成量と  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の減少量の比 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) は 0.03 から 0.05 に上昇したが、まだ推定値として 0.13 より低いレベルであり、リアクター内の Anammox 細菌の総量は徐々に増加したと推察している。Stage2 (281 日 - 310 日) においてさらに AR を下げた結果、流出水中高濃度の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  が見られ、亜硝酸化反応は律速段階となり、NRE が 24.4% に低下した。その後亜硝酸化を促進するため、Stage3 (311-335) において曝気量を増加させたところ窒素除去率は次第に 26.2% から 68.2% まで上昇し、窒素の除去が顕著になった。さらに亜硝酸化性能を強化するために、Stage4 (336-344) において AR をさらに増加させ。その結果、過量の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  が酸化され、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  濃度が急増し、 $\text{NH}_4^+$  の不足による Anammox 反応が制限され、NRE は 38.1% に低下した。

Stage5 (345-410) において AR を低下させ、流出水に残留した  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  の濃度が徐々に減少し、それに伴って、窒素除去率は徐々に回復し、360 日目に NRE は最高の 88.8% となった。その後 65% 以上の窒素除去率を約 50 日間維持することができた。Stage5 の全運転期間において窒素除去率は平均的に 73.1% であり、 $\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  が平均的に 0.14 であり、式 4 - 6 の  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  の生成量に関する反応比 0.13 に近い数値となった。しかし、その後 Stage6 (411-436) において AR を変わらず、流出水の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  と  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  濃度が同時に上昇した、窒素除去率は低下した。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  の生成量が推定生成量より高いレベルとなった。Stage7 (437-493) において曝気量をさらに上げたところ、酸素総量が増加による、亜硝酸化反応が促進されて、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度は減少した。一方で、酸素総量の増加による、NOB が酸素欠乏状態を取り除き、大量の  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  を生成し、窒素除去率は平均的に 47% に低下した。

#### 4.3.2 他の研究との比較

Lieu ら<sup>17)</sup>は部分的亜硝酸化工程で自然に約 80% の窒素除去が有機物の投入なかった条件で発生すると報告している。また、岡本ら<sup>21,22)</sup>は産業排水として負荷の大きいビール工業排水に Anammox プロセスを適用することを前提に、360L の比較的に大規模なアクリル繊維担体で微生物を固定した曝気槽を用いて Anammox 処理の前処理プロセスである部分的亜硝酸化について研究を行った。本研究と同様に、部分的亜硝酸化リアクターにおいて、窒素の 13% 以上が

消失する現象が顕在化した．以上の文献の現象は反応槽に充填した繊維担体の中が嫌気性雰囲気となり，Anammox 細菌の生育環境が整ったことがもたらした．本研究では担体ではなく，大きなフロックあるいは小さいグラニューールの内部で Anammox 細菌が増殖したと考えられる．

表 4-2 のデータは本研究と既往の一槽式独立栄養型窒素除去プロセスの結果の比較を示した．SNAP 法を用いて揺動床や固定床型リアクターにおける窒素除去については本研究とほぼ同じ結果を得られた<sup>17,22)</sup>．しかし，本研究におけるそれらにより低い温度を制御し，担体を投入がなし，依然としてほぼ同様な窒素除去を達成した．Slikers ら<sup>13)</sup>は gas-lift リアクターを用いて Anammox 汚泥を種汚泥として投入し，マイクロ曝気によって CANON 反応を利用した窒素除去速度は  $1.5\text{kg-N/m}^3/\text{d}$  を実現した．Kuai ら<sup>14)</sup>は高濃度の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  排水 ( $1000\text{mg/L}$ ) の窒素負荷を  $0.13\text{kg-N/m}^3/\text{d}$  とし OLAND 法による 40% の窒素除去しか得られなかった．

表 4-2 本研究と既往研究の比較

リアクター	排水	NLR ( $\text{kgN/m}^3/\text{d}$ )	NRE <sub>平均</sub> (%)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )
本研究 (Stage 5)	人工排水	0.5	73.1	25
SNAP (揺動床) <sup>22)</sup>	汚泥脱水液	1.6-4.1	77.0	21-34
SNAP (固定床) <sup>17)</sup>	人工排水	0.58	78.5	35
CANON (Gas-lift) <sup>13)</sup>	人工排水	3.70	39.0	7.6
OLAND (SBR) <sup>14)</sup>	人工排水	0.13	40	33



#### 4.4 結論

流入水の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度を 250mg/L, 窒素負荷を 0.5kg-N/m<sup>3</sup>/d, リアクターの温度を 25°C前後に制御して部分的亜硝酸化反応の連続実験を行った結果, 以下の結論が得られた.

- (1) 約 200 日間の安定した部分的亜硝酸化を維持できた. その後約 13%の窒素消失が発見された.
- (2) 曝気量を調整することで, Anammox 細菌が部分的亜硝酸化リアクターにおけるフロックの内部で増殖した結果, 1 つの槽で, 亜硝酸化と Anammox の共生反応系を構築することができた.
- (3) 曝気量 1.50 L/min に制御した結果, 88.8%の高い窒素除去率が得られ, 平均 73.1%の窒素除去率が維持することができた. すなわち, 1 つの反応槽で一段 Anammox を実現することができた.

## 第 4 章 参考文献

- 1) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.K., Jetten, M.S.M., The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.50, No.5, pp.589-596, 1998.
- 2) Wiesmann, U., Biological nitrogen removal from wastewater, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.51, pp.113-154, 1994.
- 3) 岡部聡, Anammox 研究開発の動向, *水環境学会誌*, Vol. 37, No. 9, pp. 316-320, 2014.
- 4) Dongen, L. G. J. M. van, M. S. M. Jetten, M. C. M. van Loosdrecht, The Combined Sharon/Anammox Process, pp. 10, IWA Publishing, London, U.K., 2001.
- 5) Furukawa, K., Tokutomi T., Imajyo U. and Kiyokawa T., Studies for demonstration operation for the new process to remove nitrogen from wastewater taken part of Anammox microorganisms (in Japanese), *The manuscripts of the 40th Conference to present research papers for Japan Sewage Works Association*, pp. 817-819, 2003.
- 6) Tokutomi, T., Development Situation of Anammox Process, *Chemical Engineering of Japan*, Vol. 70, pp. 612-615, 2006.
- 7) Takagi, K., Okuda M., Itokawa H. and Nakazawa H., Estimation of applicability to remove nitrogen from the supernatant liquor in the sludge treatment process using anammox process (in Japanese), *The manuscripts of the 46<sup>th</sup> Conference to present research papers for Japan Sewage Works Association* (in Japanese), pp 700-702, 2009.
- 8) 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化(anammox)の発見とその後の研究開発動向, *水環境学会誌*, Vol. 27, No. 7, pp. 442-447, 2004.
- 9) Lackner S., Gilbert E.M., Vlaeminck S.E., Joss A., Horn H., van Loosdrecht M.C.M., Full-scale partial nitrification / anammox experiences- An application

- survey, *Water Research*, Vol. 55, pp. 292-303, 2014.
- 10) Hippen A., Rosenwinkel K.H., Baumgarten G., Seyfried C.F., Aerobic deammonification: a new experience in the treatment of wastewater, *Water Science and Technology*, Vol. 35, No. 10, pp. 111-120, 1997.
  - 11) Wett B., Development and implementation of a robust deammonification process, *Water Science and Technology*, Vol. 56, No. 7, pp. 81-88, 2007.
  - 12) Third K.A., Sliekers A.O., Kuenen J.G., Jetten M.S., The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 24, No.4, pp. 588-596, 2001.
  - 13) Sliekers A.O., Third K.A., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., CANON and Anammox in a gas-lift reactor,” *FEMS Microbiology. Letters*, Vol. 218, pp. 339-344, 2003.
  - 14) Kuai, L. and Verstraete W., Ammonium removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 11, pp. 4500-4506, 1998.
  - 15) Pynaert, K., Smets B.F., Wyffels S., Beheydt D., Siciliano S.D., and Verstraete W., Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 6, pp. 3626-3635, 2003.
  - 16) Helmer-Madhok, C., Schmid M., Filipov E., Gaul T., Hippen A., Rosenwinkel K.H., Seyfried C.F., Wagner M., Kunst S., Deammonification in biofilm systems: population structure and function, *Water Science and Technology*, Vol. 46, No. 1-2, pp. 223-231, 2002.
  - 17) Lieu P.K., Hatozaki R., Homan H., and Furukawa K., Single-stage nitrogen removal using Anammox and partial nitrification (SNAP) for treatment of synthetic landfill leachate, *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, Vol. 41, No. 2, pp. 103-112, 2005.
  - 18) 日本下水道協会, 下水試験方法 上巻, 日本下水道協会, 東京, 1999.
  - 19) Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Shinath, E.G., Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *Journal Water*

*Pollution Control Federation*, Vol. 48, No. 5, pp. 835-852, 1976.

- 20) 劉媛, 北條俊昌, 何士龍, 甄広印, 李玉友, 酸素制御による部分的亜硝酸化の実現と維持, *土木学会論文集 G (環境)*, Vol. 70, No. 7, pp. III\_233-III\_241, 2014.
- 21) 岡本裕行, 内橋康充, ルオンゴオク カーン, 宮原照夫, 川面克行, 西山孝, 藤井隆夫, 古川憲治, anammox プロセスを活用するビール工場排水の窒素除去の前処理に関する研究, *化学工学論文集*, Vol. 35, No. 3, pp. 318-327, 2009.
- 22) 岡本裕行, 野村敦子, 西村敏男, 内橋康充, 宮原照夫, 佐藤英明, 西山孝, 藤井隆夫, 古川憲治, 一槽式 anammox リアクタの運転条件に関する研究, *化学工学論文集*, Vol. 36, No. 4, pp. 420-428, 2010.
- 23) Zhou Y., Oehmen A., Lim M., Vadivalu V., and Ng W.J., The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants, *Water research*, Vol. 45, pp. 4672-4682, 2011.
- 24) Prakasam, T.B.S., Loehr, R.C., Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes, *Water Research*, Vol. 6, No. 7, pp. 859-869, 1972.
- 25) Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Fux, C., Keller, J., The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture, *Environmental Science and Technology* Vol. 40, No.14, pp. 4442-4448, 2006.
- 26) Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Key physiology of anaerobic ammonium oxidation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 7, pp. 3248-3250, 1999.
- 27) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B., Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Archives of Microbiology*, Vol. 175, No. 3, pp. 198-207, 2001

## 第 5 章

### 担体添加型一槽式 Anammox を用いた窒素除去の研究

#### 5.1 はじめに

Anammox を核とした窒素除去プロセスは、排水中の  $\text{NH}_4^+$  の約 60% を部分的に亜硝酸に酸化する(1)部分的亜硝酸化プロセスと(1)により生成した  $\text{NO}_2^-$  と残りの  $\text{NH}_4^+$  を  $\text{N}_2$  に変換する(2)Anammox プロセスによって構成される. この二つのプロセスを同一反応槽で同時に行う手法と二つの反応槽で別々に行う手法が提案されている<sup>1)</sup>. アナモックス細菌の増殖速度(倍增時間)は 1.8-11 日間<sup>2)</sup> と極めて遅いことや、アナモックス汚泥の収率が非常に低いことが挙げられているため、アナモックス細菌を反応槽内に保持することがアナモックスプロセスの開発に重要である.

最近の報告<sup>3)</sup>によれば Anammox の実用化プロセス全体の約 9 割が一槽式を採用しており、一槽式 Anammox が主流となっている. 実用化で用いられているリアクターは 50% が半回分法で運転する SBR, 24% がアナモックス汚泥の自己造粒によりグラニュール系のリアクターである. その他が固定床リアクター, 流動床リアクター, ガスリフトリアクター, MBR 等と報告されている. 既往の報告では<sup>4)</sup>窒素除去の伴い、窒素ガスがブロック内部に貯まって、ブロックが浮上し、菌体が大量に流出ことが発生したため(本研究の第 4 章), Anammox 細菌は浮遊増殖系による培養が困難であり、生物膜系の方が適していると言われている. 近年、プラスチック担体や PVA ゲルビーズ等の流動する担体に付着させる方法が考案されている. また、不織布に付着固定する固定床型のリアクターも報告されている<sup>5)</sup>.

さらに、アナモックス細菌の属によって 0.004~0.06mg/L のレベルの FNA 濃度は Anammox 細菌活性が阻害すると報告しており<sup>6,7)</sup>, アナモックス細菌は高濃度の亜硝酸により阻害受け易いため、固定床型リアクターではなく、完全混合に近い流動床型リアクターが望ましいである.

そこで本研究では完全混合反応槽に担体を投入することにより、好気性亜硝

硝酸化細菌（NOB）活性を抑制する上で、好気性アンモニア酸化細菌(AOB)と嫌気性 Anammox 細菌を共存させ、一槽式 Anammox の連続実験を行い、担体に菌体を馴養させる同時に、窒素除去の立ち上げを行うことを目的とし、その脱窒性能、関連細菌の活性および菌体付着した担体の状況を検討した。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 実験装置および実験条件

本研究に用いた実験装置の概略図を図 5-1 に示す。リアクターはアクリル製の有効容積 5L の完全混合型反応槽である。リアクター内に担体を充填した。担体の均一な流動と付着菌体の安定保持のために、リアクターの底部に設置した散気管により曝気と攪拌を行った。温度は 25℃前後、DO 濃度を 0.20mg/L 以下に制御した。連続的に投入した人工排水は第三章と同様な単一窒素源として  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度を 250mgN/L とし、 $\text{NaHCO}_3$  を 1500mg/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を 81mg/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を 214mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を 36mg/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を 51mg/L とした。人工排水の pH は 8.0~8.5 である。水理学的滞留時間(HRT)は 12 時間とし、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の容積負荷を  $0.5\text{kg-N/m}^3 \cdot \text{d}$  とした。種汚泥は S 浄化センターの  $\text{A}_2\text{O}$  法曝気槽の活性汚泥から馴致した部分的亜硝酸化汚泥を用いた。

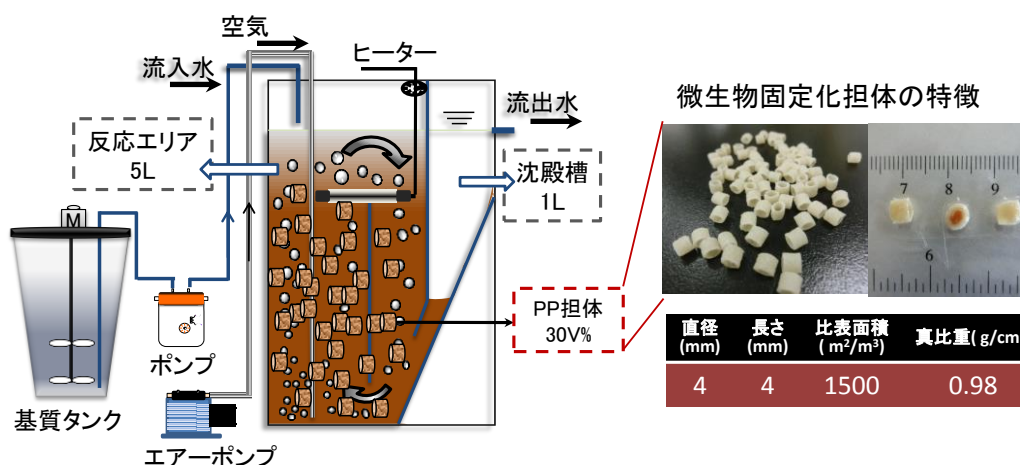


図 5-1 実験装置の概略図

### 5.2.2 測定項目と分析方法

水質分析は人工排水とリアクターの処理水について行った。採取したサンプルは Millipore 社製の  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターを通したものに対して、Agilent 7100 キャピラリー電気泳動により各態窒素濃度を測定した<sup>8)</sup>。タンパク質はアルブミンを標準物質としたフェノール - 硫酸法<sup>9)</sup>に従って分析を行った。余剰活性汚泥の化学組成としては、タンパク質、の含有率は 40~63% (対 VSS の値) であることが報告したため<sup>10-12)</sup>、本研究ではこのようなことを参考にし、タンパク質と VSS の比を 0.5 として VSS の濃度を推察した。SV30 および SVI は下水試験方法に従い測定した<sup>13)</sup>。pH は pH メーター(笠原、KP-10Z)を用いて測定した。DO および温度は TOA-DKK 社製のポータブル溶存酸素計(DO-31P)により測定した。AOB, NOB, Anammox 細菌それぞれの反応速度アンモニア酸化速度 AOR (ammonia oxidation rate), 亜硝酸酸化速度 NOR (nitrite oxidation rate), アナモックス反応による窒素除去速度 ANR (nitrogen removal rate by Anammox)は式(5-1)~式(5-4)に従って計算した。

$$\Delta N(\text{mg/L}) = \text{流入}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] - \text{流出}([\text{NH}_4^+ - \text{N}] + [\text{NO}_2^- - \text{N}] + [\text{NO}_3^- - \text{N}]) \quad (\text{式 5-1})$$

$$\text{AOR}(\text{kg} - \text{N}/\text{m}^3/\text{d}) = \frac{\text{流入}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] - \text{流出}[\text{NH}_4^+ - \text{N}] - \frac{\Delta N}{2.04}}{\text{HRT}} \quad (\text{式 5-2})$$

$$\text{NOR}(\text{kg} - \text{N}/\text{m}^3/\text{d}) = \frac{\text{流出}[\text{NO}_3^- - \text{N}] - \frac{0.26\Delta N}{2.04}}{\text{HRT}} \quad (\text{式 5-3})$$

$$\text{ANR}(\text{kg} - \text{N}/\text{m}^3/\text{d}) = \frac{\Delta N}{\text{HRT}} \quad (\text{式 5-4})$$

### 5.2.3 走査型電子顕微鏡(SEM)の観察<sup>14)</sup>

洗浄した担体を取り出し、2.5%グルタルアルデヒドを加え、常温で2~4時間放置、固定を行った。その後、固定液を捨て、緩衝液を入れ優しく振り、洗浄した。これから、脱水のため、固定した担体を50%のエタノールに5~10分浸けた。エタノールを捨て、60%、70%、80%、90%、95%、100%のエタノールにより同様な操作を行った。脱水後試験管にt-ブチルアルコールを加え、エタノールを置換する。乾燥した固定後の担体をSEM（JSM-6500F, Japan Electron Optics Laboratory Co.）により表層観察を行った。

## 5.3 実験結果および考察

### 5.3.1 リアクターの運転状況

リアクターにおける各態窒素濃度の経日変化を図5-2に示す。担体を投入し

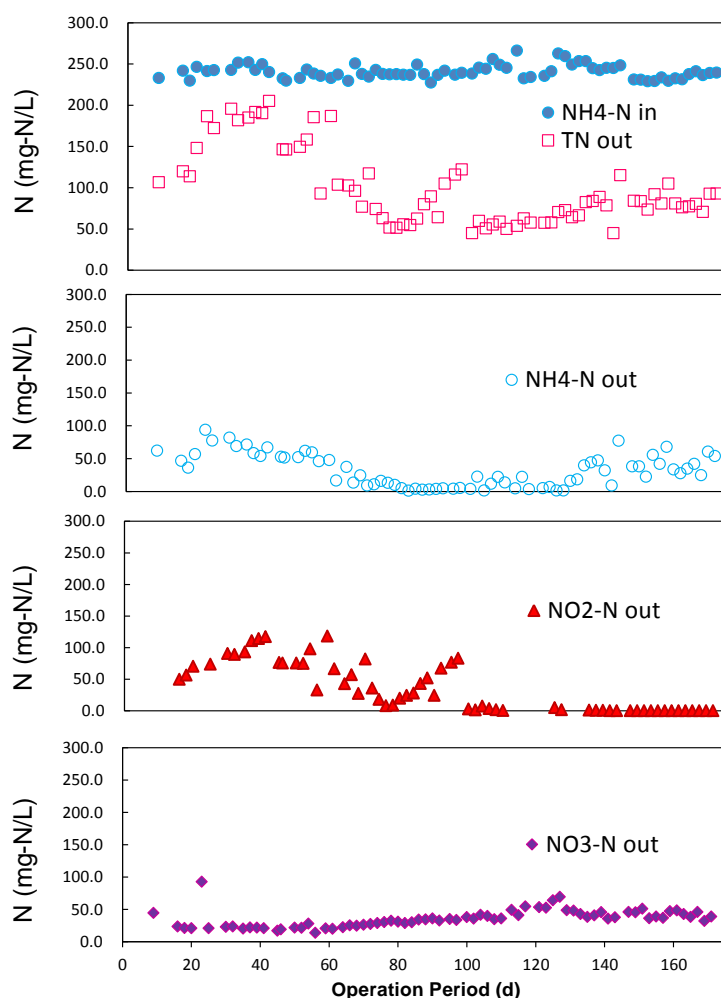


図 5-2 リアクターにおけるの経日変化



た直後、40 日目まで流出水の硝酸性窒素濃度が担体投入前より変わらなかった、アンモニア性窒素濃度が徐々に低下したが、亜硝酸性窒素の残留濃度は徐々に上昇した、その結果、流出水の TN 濃度が徐々に上昇した。100 日目から流出水の全窒素濃度は安定した。

リアクターにおける窒素除去率および  $\text{NO}_3^- \text{-N} / \Delta \text{NH}_4^+ \text{-N}$  の比の経日変化を図 5-3 に示す。担体を投入した直後、窒素の除去率は投入前の約 50% から徐々に低下した。実験の進行に伴い、40 日目から Anammox 反応が促進され、窒素の除去率は徐々に上昇し、76 日目に 78.2% となった。しかしその後窒素除去率は 100 日目に 49% に低下した。そのため 101 日目から意図的に曝気量を低下させ、AOR と ANR のバランスを調整したところ窒素除去率は回復し、最大 81.1%、平均 70.0% の窒素除去率を 70 日間維持することができた。全運転期間において、NOR は低い値であり、 $\text{NO}_3^- \text{-N} / \Delta \text{N}$  の値は平均 0.17 となった。この値は Sliekers ら<sup>18)</sup>により報告された CANON プロセスにおける理論的な値(0.13)に近いことから、リアクター内で一槽式 Anammox 反応が行われていたことが示された。

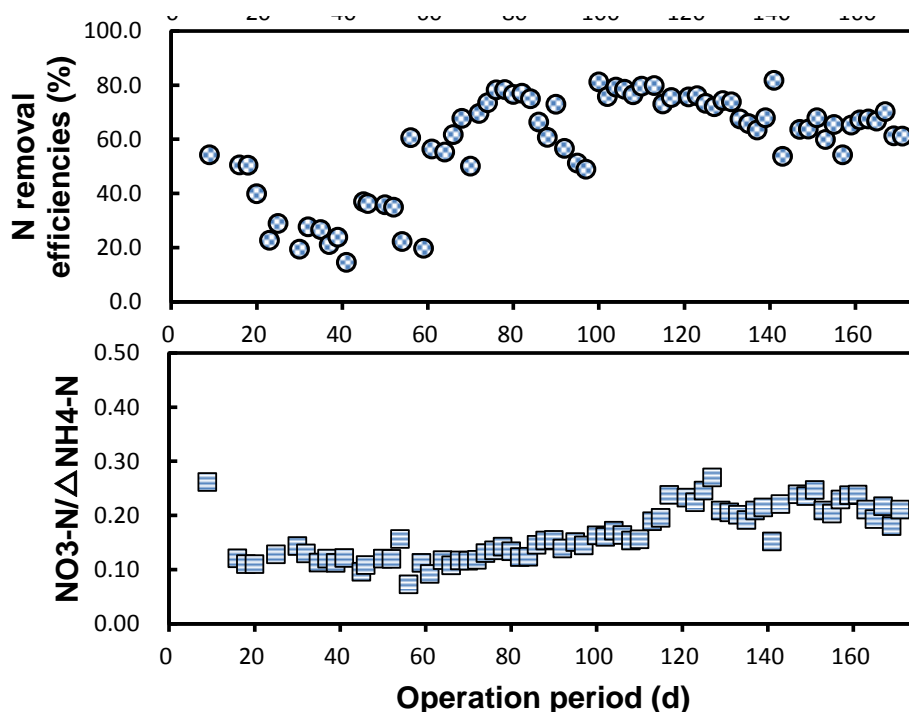


図 5-3 窒素除去率および  $\text{NO}_3^- \text{-N} / \Delta \text{NH}_4^+ \text{-N}$  の比の経日変化

### 5.3.2 担体における微生物の増殖

長期間にわたり、担体の表面と裏面では、Anammox 細菌と考えられる赤い菌塊が目視により観察でき、菌体の担体への付着状況を確認した。走査型電子顕微鏡(SEM)による担体投入前と投入後 143 日目の表層観察の結果を図 5-4 に示す。菌体が付着する前の担体表面と裏面は平滑であり、多孔化を確認することができた。143 日目の担体の表層観察では孔径が小さくなり、菌体の付着が見られ、多くの桿菌と球菌およびそれらを取り囲む糸状菌が確認できた。

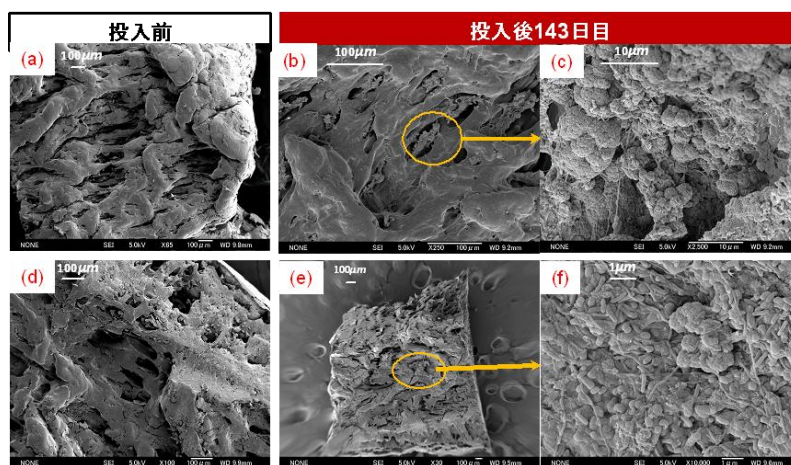


図 5-4 担体表面 (a-c) および裏面 (d-f) の菌体付着前後の様子

## 5.4 結論

- (1) 担体の添加により完全混合反応槽を用いた一槽式 Anammox プロセスを約 80 日でスタートアップできた。25℃、容積負荷  $0.5\text{kg-N/m}^3 \cdot \text{d}$  の条件下において平均 70.0%，最大 81.1%の窒素除去率を確認できた。
- (2) SEM 観察の結果によりリアクター内の担体は Anammox 細菌の増殖空間を提供したと考えられる。

## 第5章 参考文献

- 1) 岡部聡, Anammox 研究開発の動向, 水環境学会誌, Vol. 37, No. 9, pp. 316-320, 2014.
- 2) Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G., and Jetten M.S.M., The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 50, No. 5, pp. 589-596, 1998.
- 3) Isaka K., Date Y., Sumino T., Yoshie S., and Tsuneda S., Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 70, No. 1, pp. 47-52, 2006.
- 4) Lackner S., Gilbert E.M., Vlaeminck S.E., Joss A., Horn H., van Loosdrecht M.C.M., Full-scale partial nitrification / anammox experiences- An application survey, *Water Research*, Vol. 55, pp. 292-303, 2014.
- 5) Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.M., Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations, *Water Research*, Vol. 31, pp. 1955-1962, 1997.
- 6) Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Key physiology of anaerobic ammonium oxidation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 7, pp. 3248-3250, 1999.
- 7) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B., Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Archives of Microbiology*, Vol. 175, No. 3, pp. 198-207, 2001
- 8) Vilas-Cruz, M., Go´mez, J., Me´ndez, R., and Lema, J. M., Simultaneous determination of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in wastewater by capillary electrophoresis. Proc., III Int. Symp. of Analytical Methodology for the Environment, Vol. II, Association of Environmental Science and Techniques, Barcelona, Spain, pp.1-50, 1994 (in Spanish).

- 9) 菅原潔, 副島正美, 蛋白質の定量法, 学会出版社センター, 東京, pp. 95-131, 1982.
- 10) 李玉友, 野池達也, 嫌気性消化の酸生成相における余剰活性汚泥の分解特性, 水質汚濁研究, Vol. 10, NO. 12, pp. 729-740, 1987.
- 11) 大嶋吉雄, バイオテクノロジーを応用した汚泥の有効利用, 月刊下水道, Vol. 9, No. 13, pp. 24-31, 1986.
- 12) Sears K.J., Alleman J.E., Gong W.L., Feasibility of using ultrasonic irradiation to recover biomass from waste activated sludge, Journal of Biotechnology, Vol. 119, pp. 389-399, 2005.
- 13) 日本下水道協会, 下水試験方法 上巻, 日本下水道協会, 東京, 1999.
- 14) Zhen G.Y., Lu X.Q., Li Y.Y., Zhao Y.C., Combined electrical-alkali pretreatment to increase the anaerobic hydrolysis rate of waste activated sludge during anaerobic digestion, *Applied Energy*, Vol. 128, pp. 93-102, 2014.

## 第 6 章 総括および展望

### 6.1 総括

湖沼や内湾などの閉鎖性水域の富栄養化を防止するために、様々な排水から富栄養化原因物質の一つである窒素を除去することが必要である。近年、省資源・省エネルギー型排水処理技術の開発が求められ、嫌気性アンモニア酸化（Anammox）法を用いた新規窒素処理方法が注目されている。しかし、一般的な排水にはアンモニア性窒素があるものの、Anammox 反応に必要な亜硝酸がほとんどないので、部分的亜硝酸化の確保が必要になるだけでなく、部分的亜硝酸化と Anammox の両反応の融合制御も重要な課題となっている。本研究は部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスを構築することを目的として、人工排水を対象とした室内実験を行い、部分的亜硝酸化と一槽式 Anammox の制御方法を検討した。本論文は 6 章からなる。

第 1 章「序論」では、本研究の背景、研究の目的、意義について整理し、本論文の構成について述べた。

第 2 章「既往の研究と研究課題の整理」では、窒素除去のための生物学的処理方法に関する既往研究および Anammox プロセスに関する最新の知見についてレビューし、本研究の目的である「部分的亜硝酸化反応とアナモックス反応を融合した新規窒素除去プロセスの研究」に関わる問題点を整理し、本研究の位置付けを明らかにした上で、解明すべき課題を抽出した。

第 3 章「酸素制御による部分的亜硝酸化の実現と維持」では、Anammox の前処理として部分的亜硝酸化の制御のために、運転パラメータである DO 濃度と曝気量による影響を検討した。まず DO 濃度を 0.80mg/L 以下に制御したことによって NOB の活性が阻害され、100%の亜硝酸化が実現できた。次に、リアクター内の DO 濃度を 0.12mg/L の低濃度に制御するとともに曝気量を調整することで 57%の  $\text{NO}_2^-$ -N 生成率を安定的に得ることができた。本研究より部分的亜

硝酸化を制御するための運転操作方法を把握できた。

第4章「部分的亜硝酸化リアクターにおける Anammox 反応への転換」では、部分的亜硝酸化反応の連続実験を行った結果、約 200 日間の安定した部分的亜硝酸化を維持することができたが、その後約 13%の窒素除去が見られ、Anammox 反応の進行が示唆された。そこで、曝気量を調整して1つの反応槽における亜硝酸化と Anammox の共生反応系の実現を試みた結果、曝気量を適切に制御した結果、平均 73.1%の窒素除去率を長期間に維持することができた。本章より一槽式 Anammox 反応の実現可能性とその処理性能が示された。

第5章「担体添加型一槽式 Anammox を用いた窒素除去の研究」では、一槽式 Anammox 反応槽の効率化を目指して、担体を添加して担体添加型一槽式 Anammox プロセスについて連続実験を行った。窒素容積負荷  $1.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{d}$  の条件下において平均 76.2%、最大 84.8%の窒素除去率が得られた。

第6章「総括および展望」では、本研究で得られた研究成果を総括した上で今後の研究課題を展望した。

## 6.2 今後の研究課題と展望

本研究により安定した部分的亜硝酸化を実現と維持することができ、担体なしおよび担体添加型一槽式 Anammox プロセスは有効な窒素除去プロセスであることが示されたが、以下に示す通りの研究課題があり、更なるプロセスの効率化が期待できる。

- (1) 高濃度と低濃度窒素含有排水処理および菌叢解析の検討
- (2) 窒素排水の超高温および低温処理の検討
- (3) 部分的亜硝酸化の効率化の検討
- (4) C/N 比が窒素除去に及ぼす影響の検討
- (5) 汚泥浮上問題の解決の検討

## 使用記号

Anammox	: アナモックス (Anaerobic ammonium oxidation)
ANR	: アナモックスによる窒素除去速度 (Nitrogen removal Rate by Anammox)
AOB	: アンモニア酸化細菌 (Ammonium Oxidizing Bacteria)
AOR	: アンモニア酸化速度 (Ammonium Oxidizing Rate)
AR	: 曝気量 (Aeration Rate) , L/min
BOD	: 生物化学的酸素要求量 (Biochemical Oxygen Demand) , mg/L
CANON	: Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite
COD	: 化学的酸素要求量 (Chemical Oxygen Demand) , mg/L
CSTR	: Continuous Stirred-Tank Reactor
DEMON	: aerobic/anoxic deammonification
DO	: 溶存酸素 (Dissolved Oxygen) , mg/L
EPS	: 菌体外高分子物質 (Extracellular Polymeric Substances)
FA	: Free ammonia
FNA	: Free nitrous acid
$\Delta G^\circ$	: 標準自由エネルギー変化
HRT	: 水理学的滞留時間 (Hydraulic Retention Time) , day
MBR	: Membrane Bioreactor
MLSS	: 活性汚泥浮遊物質 (Mixed Liquor Suspended Solids) , mg/L
MLVSS	: 活性汚泥の強熱減量 (Mixed Liquor Volatile Suspended Solids) , mg/L
NOB	: 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria)
NOR	: 亜硝酸酸化速度 (Nitrite Oxidizing Rate)
$N_R$	: 亜硝酸性窒素とアンモニア性窒素の比
NRE	: 窒素除去率 (Nitrogen Removal Efficiency)
NRR	: 窒素除去速度 (Nitrogen Removal Rate)
OLAND	: Oxygen Limited autotrophic Nitrification-Denitrification

SBR	:	Sequencing Batch Reactor
SEM	:	走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope)
SHARON	:	Singel rector High activity Ammonia Removal Over Nitrite
SNAP	:	Singel-stage Nitrogen removal using Anammox and Partial nitrification
SRT	:	污泥滯留時間 (Sludge Retention Time), day
SV30	:	污泥沈降率 (Sludge Volume) , %
SVI	:	污泥容量指標 (Sludge Volume Index) , g/mL
TN	:	Total Nitrogen
TP	:	Total Phosphorus
UASB	:	上向流式嫌気性污泥床 (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket)



## 謝辞

本研究の進めおよび論文を完成するに当たり，終始適当な助言を賜り，また丁寧かつ熱心な御指導をしてくださいました，東北大学大学院教授 李玉友先生に心から感謝を申し上げます。

本論文の審査に当たり，東北大学大学院教授 風間聡先生，東北大学大学院教授 西村修先生に厚く御礼を申し上げます。

本研究の進みに当たり，忙しい中で熱心に菌叢解析について御指導して下さいました，東北大学大学院准教授 久保田健吾先生に深く感謝を申し上げます。

本研究を始める機会を与えて下さり，大学院生活の全てに渡り終始一貫熱心に分析装置の使用方法，研究の意義を御指導して頂きました東北大学大学院助教 北條俊昌先生に厚く感謝を申し上げます。

本研究を進める上で常に温かい心を持って御協力して頂きました東北大学技術補佐員 遠藤厚巳氏，丸尾知佳子氏，千葉信男氏に深く感謝を申し上げます。

共同研究者として，反応槽の運転およびサンプルの測定を御協力して下さいました東北大学大学院博士前期課程の紀佳淵氏には深く感謝を申し上げます，

未熟な著者を多くの御助言を下さった甄広印博士，何士龍博士，牛啓桂博士の先輩方，陸雪琴氏，呉麗桀氏，張彦隆氏の後輩方および研究生活を共にした環境保全工学および都市・地域環境システム学の諸氏に御礼を申し上げます。

最後に長期間の留学生活に渡り著者を信じ，終始温かく見守り応援し続けてくれた家族に心から感謝し，謝辞と致します。

2015 年 9 月 劉 媛